

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 598**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/55** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14722463 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2970423**

54 Título: **Muteínas de interleuquina-2 para la expansión de las células T reguladoras**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361784669 P**

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

**15.01.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GAVIN, MARC A.;  
KANNAN, GUNASEKARAN;  
LI, LI;  
PEARSON, JOSHUA T. y  
KAROW, MARGARET**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 737 598 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

Muteínas de interleuquina-2 para la expansión de las células T reguladoras

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente US nº de serie 61/784.669, presentada el 14 de marzo de 2013.

10 Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud que se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónica mediante el sistema de presentación electrónica EFS-Web. El listado de secuencias se proporciona en forma de un archivo de nombre A-1826-WO-PCT\_ST25.txt, creado el 25 de febrero de 2014, que presenta 40.849 bytes de tamaño. La información en el formato electrónico del listado de secuencias se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Antecedentes

20 IL-2 se une a tres subunidades de receptor transmembranal: IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ , que juntas activan sucesos de señalización intracelular al unirse IL-2, y CD25 (IL-2R $\alpha$ ), que sirve para estabilizar la interacción entre IL-2 e IL-2R $\beta\gamma$ . Las señales proporcionadas por IL-2R $\beta\gamma$  incluyen las de las rutas de PI3-quinasa, Ras-MAP-quinasa y STAT5.

25 Las células T requieren la expresión de CD25 para responder a las concentraciones bajas de IL-2 que se observan típicamente en los tejidos. Entre las células T que expresan CD25 se incluyen tanto las células T reguladoras FOXP3<sup>+</sup> (células Treg), las cuales resultan esenciales para suprimir la inflamación autoinmunitaria, como las células T FOXP3<sup>-</sup> que han sido activadas para expresar CD25. Las células T efectoras FOXP3<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> (Teff) pueden ser células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, contribuyendo ambas a la inflamación, autoinmunidad, rechazo del injerto de órgano o enfermedad del injerto contra el huésped. La señalización de STAT5 estimulada por IL-2 resulta crucial para el crecimiento y supervivencia normal de las células T-reg y para una expresión elevada de FOXP3.

30 En el documento copropietario nº WO 2010/085495, los presentes inventores describen la utilización de muteínas de IL-2 para expandir o estimular preferentemente las células Treg. Al administrarlas en un sujeto, el efecto de las células Treg resulta útil para tratar las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Aunque las muteínas de IL-2 descritas en dicha referencia resultan útiles para expandir las células Treg sobre las Teff *in vivo*, resultó deseable crear muteínas de IL-2 que presentaban atributos óptimos para un terapéutico humano.

35 El documento nº WO2009/061853 se refiere a polipéptidos IL-2 mutantes que actúan como antagonistas de receptores. Los polipéptidos IL-2 mutantes se unen a CD25 pero realmente no activan el receptor de IL-2.

40 Resumen

En la presente memoria se describen muteínas de IL-2 que permiten la fabricación con un alto rendimiento y presentan una actividad farmacológica optimizada. En el esfuerzo para producir un terapéutico humano basado en muteína de IL-2 ejemplar, se produjeron varias observaciones inesperadas e impredecibles. Las muteínas de IL-2 descritas en la presente memoria son el resultado de dicho esfuerzo.

45 Las muteínas de IL-2 descritas en la presente memoria presentan un número mínimo de alteraciones de IL-2, reduciendo de esta manera la probabilidad de crear una respuesta inmunológica contra la muteína de IL-2 y/o la IL-2 endógena, manteniendo, sin embargo, la expansión y activación preferentes de Treg. Además, en determinadas exposiciones, la muteína de IL-2 se fusiona con una molécula, p.ej., un anticuerpo Fc, que incrementa la semivida en suero al administrarla en el sujeto. Las muteínas de IL-2 presentan una semivida en suero corta (3 a 5 h para la inyección subcutánea). Las fusiones de Fc y muteína de IL-2 ejemplares indicadas en la presente memoria presentan una semivida en el ser humano de por lo menos 1 día, por lo menos 3 días, por lo menos 5 días, por lo menos 10 días, por lo menos 15 días, por lo menos 20 días o por lo menos 25 días. Este efecto sobre la farmacocinética de las muteínas de IL-2 permite una administración reducida o menos frecuente del terapéutico de muteína de IL-2.

50 Además, al crear una molécula farmacéutica grande, debe considerarse la capacidad de producir la molécula de gran tamaño en grandes cantidades, minimizando simultáneamente la agregación y maximizando la estabilidad de la molécula. Las moléculas de fusión de muteína de IL-2-Fc muestran tales atributos.

60 Específicamente, la invención proporciona en el primer aspecto una proteína de fusión de Fc que comprende un Fc y una muteína de interleuquina 2 humana (IL-2) que comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC iD nº 1, en la que dicha muteína de IL-2 estimula las células T reguladoras.

65 La Fc puede ser una Fc de IgG1 humana o una Fc de IgG1 humana que comprende una o más mutaciones que alteran

la función efectora de dicho Fc, tal como una sustitución en N297 y/o una sustitución o delección en la lisina C-terminal de dicho Fc de IgG humano.

5 La proteína de fusión de Fc puede incluir un conector para conectar las partes de Fc y de muteína de IL-2 humana de dicha proteína, tal como GGGGS (SEC ID nº 5), GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº 7), también se encuentra incluida.

10 También se encuentra incluida la proteína de fusión de Fc, en la que la muteína de IL-2 puede comprender además una adición, sustitución o delección de aminoácido que altera la glucosilación de dicha proteína de fusión de Fc al expresarse en células de mamífero. La proteína de fusión de Fc puede comprender un dímero de Fc de dos muteínas de IL-2 o una única muteína de IL-2 también se encuentra incluida. La proteína de fusión de Fc del primer aspecto que presenta la secuencia SEC ID nº 18, también se encuentra incluida en la invención.

15 La invención proporciona además un ácido nucleico aislado codificante de la proteína de fusión de Fc del primer aspecto. El Fc puede ser un Fc de IgG1 humano.

20 Se proporciona además una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado y dicha célula huésped puede ser una célula procariótica, tal como *E. coli* o una célula eucariótica, tal como una célula de mamífero que incluye, aunque sin limitación, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés).

25 Se proporciona además un método de producción de la proteína de fusión de Fc que comprende cultivar una célula huésped de la invención y recolectar la proteína de fusión de Fc a partir de dicho cultivo. La invención proporciona además una muteína de IL-2 humana que comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1 o una proteína de fusión de Fc para la utilización en un método *in vivo* de tratamiento de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria.

30 Se proporciona además una muteína de IL-2 de la invención o proteína de fusión de Fc de la invención para la utilización en un método *in vivo* de tratamiento de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, tal como enfermedad atópica, enfermedad autoinmunitaria paraneoplásica, inflamación de cartilago, 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 SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis juvenil, artritis sorriática juvenil, escleroderma 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 SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis, dermatomiositis, artritis sorriática, escleroderma, vasculitis, miolitis, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjögren, soriasis, soriasis de placas, soriasis guttata, soriasis inversa, soriasis pustular, soriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad del injerto contra el huésped, vasculitis inducida por hepatitis C, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, pérdida espontánea del feto, enfermedades atópicas, enfermedades intestinales inflamatorias, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, EPOC, rinosinusitis, rinosinusitis con pólipos, esofagitis eosinofílica, bronquitis eosinofílica, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis (p.ej., enfermedad de Graves), enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, rechazo del trasplante o daño renal.

45 Además, en determinadas realizaciones, la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc contiene una región Fc de IgG1. En caso de que resulte deseable anular las funciones efectoras de IgG1 (p.ej., la actividad de ADCC), se encontró que la mutación de la asparagina en la posición 297 en glicina (N297G, esquema de numeración EU) mejoraba en gran medida la eficiencia de purificación y las propiedades biofísicas respecto a otras mutaciones que conducen a una aglucosilación de Fc de IgG1. En exposiciones preferentes, las cisteínas se manipulan en Fc para permitir enlaces disulfuro, que incrementan la estabilidad de la molécula que contiene Fc aglucosilada. La utilidad de Fc aglucosilada va más allá del contexto de fusión de muteína de IL-2-Fc. De esta manera, en la presente memoria se proporcionan moléculas que contienen Fc, fusiones y anticuerpos Fc, que comprenden una sustitución N297G y opcionalmente una sustitución de uno o más residuos adicionales por cisteína.

50 Otro aspecto de la invención incluye conectores peptídicos glucosilados. Entre los péptidos conectores preferentes que permiten la N-glucosilación se incluyen GGNGT (SEC ID nº 6) o YGNGT (SEC ID nº 7).

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona una muteína de interleuquina-2 (IL-2) humana que comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1, en la que dicha muteína de IL-2 preferentemente estimula las células T reguladoras. La muteína de IL-2 humana puede comprender una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1. Dicha muteína puede comprender la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1. La posición 125 puede ser una alanina. En otra, la posición 125 puede ser una cisteína.

65

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión de Fc que comprende una Fc y una muteína de IL-2 humana. En una realización, la Fc es una Fc de IgG1 humana. En otra realización, la Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones que alteran la función efectora de dicha Fc. En otra realización, la IgG1 humana comprende una sustitución en N297. La sustitución en N297 puede ser N297G. La proteína de fusión de Fc puede comprender una sustitución o delección de la lisina C-terminal de dicha Fc de IgG humana. La lisina C-terminal de dicha Fc de IgG humana puede deleccionarse. En otra realización, un conector conecta las partes de Fc y de muteína de IL-2 humana de dicha proteína. En otra realización, el conector es GGGGS, GGNGT o YGNGT. En otra realización, el conector es GGGGS. En otra realización, la muteína de IL-2 comprende además una adición, sustitución o delección de aminoácido que altera la glucosilación de dicha proteína de fusión de Fc al expresarse en las células de mamífero. La muteína de IL-2 puede comprender una sustitución T3, tal como una sustitución T3N o T3A. La muteína de IL-2 puede comprender además una mutación S5, tal como una mutación S5T. En otra realización, la proteína de fusión de Fc comprende un dímero de Fc de dos muteínas de IL-2 o dicha proteína de fusión de Fc comprende una única muteína de IL-2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado codificante de una muteína de IL-2 humana o una parte Fc de un anticuerpo y una muteína de IL-2 humana. Dicha parte de Fc de un anticuerpo y la muteína de IL-2 humana puede estar codificada dentro de un único marco de lectura abierto. En otra realización, la Fc es una Fc de IgG1 humana. En otra realización, la Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones que alteran la función efectora de dicha Fc. En otra realización, la IgG1 humana comprende una sustitución en N297. La sustitución en N297 puede ser N297G. En otra realización, la Fc de IgG1 humana comprende una sustitución o delección de la lisina C-terminal. En otra realización, la lisina C-terminal de dicha Fc de IgG humana se deleciona. En otra realización, el ácido nucleico codifica además un conector que conecta la parte Fc de un anticuerpo y la muteína de IL-2 humana. En otra realización, el conector es GGGGS, GGNGT o YGNGT. En otra realización, el conector es GGGGS. En otra realización, la muteína de IL-2 comprende además una adición, sustitución o delección de aminoácido que altera la glucosilación de una proteína que comprende dicha muteína de IL-2 al expresarse en células de mamífero. La muteína de IL-2 puede comprender una sustitución T3, tal como una sustitución T3N o T3A. La muteína de IL-2 puede comprender además una mutación S5, tal como una mutación S5T.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado tal como se ha indicado anteriormente operablemente ligado a un promotor.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado tal como se ha indicado anteriormente. En una exposición, el ácido nucleico aislado se encuentra operablemente ligado a un promotor. En otra realización, dicha célula huésped es una célula procariótica. En otra realización, la célula huésped es *E. coli*. En otra realización, dicha célula huésped es una célula eucariótica. En otra realización, la célula huésped es una célula de mamífero. En otra realización, la célula huésped es una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de una muteína de IL-2 humana, que comprende cultivar una célula huésped tal como se ha indicado anteriormente bajo condiciones en las que dicho promotor se expresa y recolectar la muteína de IL-2 humana a partir de dicho cultivo. En una realización, el método comprende cultivar una célula huésped tal como se ha indicado anteriormente bajo condiciones en las que dicho promotor se expresa y recolectar la proteína de fusión de Fc a partir de dicho cultivo.

En otra exposición, la presente invención proporciona un método para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras dentro de una población de células T, que comprende poner en contacto la población de células T con una cantidad eficaz de una muteína IL-2 humana indicada anteriormente. En una realización, la proporción de células CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> a células CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> se incrementa, tal como en como mínimo 50%.

En otra exposición, la presente invención proporciona un método para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras dentro de una población de células T, que comprende poner en contacto la población de células T con una cantidad eficaz de una proteína de fusión de Fc indicada anteriormente. En una realización, la proporción de células CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> a células CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> se incrementa, tal como en como mínimo 50%.

En otra exposición, la presente invención proporciona un método para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras en la sangre periférica de un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una muteína de IL-2 humana indicada anteriormente. En una realización, la proporción de células CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> a células CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> se incrementa, tal como en como mínimo 50%.

En otra exposición, la presente invención proporciona un método para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras en la sangre periférica de un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína de fusión de Fc indicada anteriormente. En una realización, la proporción de células CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> a células CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> se incrementa, tal como en como mínimo 50%.

5 En otra exposición, la presente invención proporciona un método para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras en la sangre periférica de un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una muteína de IL-2 humana indicada anteriormente. En una exposición, la proporción de células CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> a linfocitos CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> que expresan CD56 y/o CD16 se incrementa, tal como en como mínimo 50%.

10 En otra exposición, la presente invención proporciona un método para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células asesinas naturales (NK) en la sangre periférica de un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína de fusión de Fc indicada anteriormente. En una exposición, la proporción de células CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> a linfocitos CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> que expresan CD56 y/o CD16 se incrementa, tal como en como mínimo 50%.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona la muteína de IL-2 o la proteína de fusión de Fc de la invención para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de IL-2 indicada anteriormente.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona la muteína de IL-2 o la proteína de fusión de Fc de la invención para la utilización en un método de tratamiento de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de Fc indicada anteriormente. En una exposición, la administración causa la reducción de por lo menos un síntoma de la enfermedad. En otra exposición, la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras en la sangre periférica de un sujeto se incrementa después de la administración. En otra exposición, la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras en la sangre periférica de un sujeto se mantiene esencialmente igual después de la administración. En otra realización, la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria es lupus, enfermedad del injerto contra el huésped, vasculitis inducida por hepatitis C, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, pérdida espontánea del feto, enfermedades atópicas o enfermedades intestinales inflamatorias.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una región Fc de un anticuerpo IgG1 humano, en el que dicha región Fc comprende una mutación N297G y dicha región Fc de una IgG1 humana comprende una identidad de por lo menos 90% respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID n° 3. En una exposición, la región Fc de una IgG1 humana comprende una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID n° 3. En otra exposición, la región Fc de una IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID n° 3. En otra exposición, la región Fc de una IgG1 humana comprende además una o más mutaciones para estabilizar el polipéptido. En otra exposición, uno o más aminoácidos indicados en SEC ID n° 3 se sustituyen por cisteína. En otra exposición, V259, A287, R292, V302, L306, V323, o 1332 de la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID n° 3 se sustituyen por cisteína. En otra exposición, la región Fc comprende una sustitución A287C y L306C en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC id n° 3. En otra exposición, la región Fc comprende una sustitución V259C y L306C en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC id n° 3. En otra exposición, la región Fc comprende una sustitución R292C y V302C en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC id n° 3. En otra exposición, la región Fc comprende una sustitución V323C y I332C en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC id n° 3.

45 En otra exposición, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende una región Fc indicada anteriormente.

En otra exposición, la presente invención proporciona una proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc indicada anteriormente.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un conector, en el que el conector es GGNGT o YGNGT. El conector puede comprender N-glucosilación. El conector puede insertarse o sustituir un bucle en la estructura del polipéptido.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de una molécula que contiene Fc de IgG1 aglucosilado, comprendiendo dicho método expresar un ácido nucleico codificante de un polipéptido indicado anteriormente en un cultivo de células de mamífero y recolectar la molécula que contiene Fc de IgG1 aglucosilado a partir de dicho cultivo.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una molécula que contiene Fc de IgG aglucosilado al expresarse en células de mamífero, comprendiendo dicho método la etapa de mutar un codón para N297 en la región de Fc en un codón de glicina.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión de Fc que consiste en la secuencia SEC ID n° 18 o SEC ID n° 20. En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico codificante de la fusión de Fc. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende el ácido nucleico. En otra realización, la presente invención proporciona un método para producir la proteína de fusión de Fc, que comprende

incubar la célula bajo condiciones que le permiten expresar dicha proteína de fusión de Fc. En otra realización, la presente invención proporciona la proteína de fusión de Fc para la utilización en un tratamiento de una condición inflamatoria o autoinmunitaria. En otra realización, la condición inflamatoria o autoinmunitaria es la enfermedad del injerto contra el huésped.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para monitorizar la respuesta de un sujeto al tratamiento con una muteína de interleuquina-2 (IL-2) humana indicada anteriormente o una proteína de fusión de Fc indicada anteriormente, que comprende detectar un cambio en dicho sujeto, siendo dicho cambio un incremento de la temperatura corporal, un incremento de la proteína C-reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) en la sangre periférica de dicho sujeto, una reducción de las plaquetas en la sangre periférica de dicho sujeto, una reducción de los neutrófilos en la sangre periférica de dicho sujeto, o una reducción de la albúmina en la sangre periférica de dicho sujeto, en el que dicho tratamiento se termina, se suspende, se reduce la frecuencia de administración, o se reduce la cantidad dosificada después de detectar dicho cambio. En una realización, dicho cambio comprende un incremento de la temperatura corporal de por lo menos 0,5°C, un incremento de la CRP en la sangre periférica de dicho sujeto de por lo menos 0,2 mg/ml, una reducción de las plaquetas en la sangre periférica de dicho sujeto de por lo menos 0,8 veces, una reducción de los neutrófilos en la sangre periférica de dicho sujeto de por lo menos 0,8 veces, o una reducción de la albúmina en la sangre periférica de dicho sujeto de por lo menos 0,4 veces.

#### Breve descripción de las figuras

Fig. 1. En un ensayo de estimulación a corto plazo, la homodimerización mediante fusión con el extremo C-terminal de Fc de IgG no altera la actividad de las muteínas de IL-2 con potencia reducida y con elevada afinidad para CD25.

Fig. 2A y fig. 2B. Las muteínas de IL-2 con las mutaciones indicadas y fusionadas con el extremo C-terminal de un lado de un heterodímero de Fc se sometieron a ensayo para su capacidad de estimular la fosforilación de STAT5 en las células T. Estas muteínas contenían además tres mutaciones que proporcionan una afinidad elevada para CD25 (V69A, N71R, Q74P). Se comparó su actividad con las tres formas de IL-2 sin fusión de Fc (símbolos blancos): WT IL-2, HaWT (afinidad elevada para CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) y HaD (afinidad elevada para CD25 y actividad de señalización reducida) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). Se muestran las respuestas de fosfo-STAT5 para las células T FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> seleccionadas.

Fig. 3. Proliferación de subgrupos de células T en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con heterodímero de Fc. Se comparó la actividad de las proteínas de fusión con tres formas de IL-2 sin fusión de Fc (símbolos blancos): WT IL-2, HaWT (afinidad elevada para CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) y HaD (afinidad elevada para CD25 y actividad de señalización reducida) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

Fig. 4. Proliferación de células NK en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con heterodímero de Fc. Se comparó la actividad de las proteínas de fusión con tres formas de IL-2 sin fusión de Fc (símbolos blancos): WT IL-2, HaWT (afinidad elevada para CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) y HaD (afinidad elevada para CD25 y actividad de señalización reducida) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D).

Fig. 5. Proliferación de subgrupos de células T en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con homodímero de Fc N297G. Se comparó la actividad de Fc.muteínas con IL-2 WT (círculos blancos) y Fc.WT (círculos negros). Las mutaciones que conferían afinidad elevada para CD25 (HaMut1) eran V69A y Q74P.

Fig. 6. Proliferación de células NK en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con homodímero de Fc N297G. Se comparó la actividad de Fc.muteínas con IL-2 WT (círculos blancos) y Fc.WT (círculos negros).

Fig. 7A y fig. 7B. Fc.muteínas de IL-2 sin mutaciones que confieren afinidad elevada para CD25 estimulan la expansión de las Treg y la regulación positiva de FOXP3 en ratones humanizados.

Fig. 8. Las dosis semanales bajas (0,5 µg por animal) de Fc.muteínas de IL-2 estimulan la expansión de Treg y la regulación positiva de FOXP3 en ratones humanizados, observándose mejor actividad de Fc.V91K que de Fc.N88D y Fc.WT.

Fig. 9A. Fc.V91K y Fc.N88D persisten sobre la superficie de las células T activadas mediante asociación con CD25.

Fig. 9B. Persistencia de la señalización de IL-2R con Fc.V91K y Fc.N88D en comparación con Fc.WT.

Fig. 10A y B. Comparación de intervalos de administración de dos semanas y de cuatro semanas de Fc.V91K en monos Cynomolgus y comparación de las vías de administración i.v. y s.c.

Fig. 11A-F. Cinética de respuestas celulares, temperatura corporal y

Fig. 12A. Efecto de dosis crecientes de PROLEUKIN®, Fc.V91K o Fc.N88D sobre los niveles de las células Treg, células NK, células T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> y células T CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> en monos Cynomolgus. Cada punto de datos representa las respuestas pico medias de cuatro animales.

Fig. 12B. Efecto de dosis crecientes de PROLEUKIN®, Fc.V91K, o Fc.N88D sobre los niveles de células Treg y eosinófilos en monos Cynomolgus. Cada punto de datos representa las respuestas pico medias de cuatro animales.

Fig. 12C. Efecto de dosis crecientes de PROLEUKIN®, Fc.V91K, o Fc.N88D sobre los niveles de células Treg y CRP, y sobre la temperatura corporal en monos Cynomolgus. Cada punto de datos representa las respuestas pico medias de cuatro animales.

Fig. 12D. Efecto de dosis crecientes de PROLEUKIN®, Fc.V91K, o Fc.N88D sobre los niveles de células Treg, plaquetas, neutrófilos y albúmina en monos *Cynomolgus*. Cada punto de datos representa las respuestas pico medias de cuatro animales. Los ejes y derechos están invertidos para mostrar el factor de reducción de plaquetas, neutrófilos o albúmina respecto a las muestras predosis.

Fig. 13. Cinética del desarrollo de anticuerpos antifármaco (AAF) en monos *Cynomolgus* tratados con Fc.V91K.

#### Descripción detallada

Los títulos de sección utilizados en la presente memoria presentan fines organizativos únicamente y no deben interpretarse como limitativos de la materia objeto descrita.

Pueden utilizarse técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos y transformación, purificación de proteínas, etc. Pueden llevarse a cabo reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o tal como se describen en la presente memoria. Los procedimientos y técnicas siguientes pueden llevarse a cabo generalmente según métodos convencionales bien conocidos de la técnica y tal como se describen en referencias generales y más específicas que se citan y comentan en toda la especificación. Ver, p.ej., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada y los procedimientos y técnicas de laboratorio, química analítica, química orgánica y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y utilizados comúnmente en la técnica. Pueden utilizarse técnicas estándares para la síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

#### IL-2

Las muteínas de IL-2 indicadas en la presente memoria son variantes de la IL-2 humana de tipo salvaje. Tal como se utiliza en la presente memoria, "IL-2 humana de tipo salvaje", "IL-2 de tipo salvaje" o "IL-2 WT" significan el polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos siguiente:

APTSSSTKKTQLQLLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLLQCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLR

PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

en la que X es C, S, V, o A (SEC ID n° 2).

Las variantes pueden contener una o más sustituciones, deleciones o inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la IL-2 de tipo salvaje. Los residuos se denominan en la presente memoria mediante un código de aminoácido de una letra seguido de la posición de aminoácido en IL-2, p.ej., K35 es el residuo de lisina en la posición 35 de la SEC ID n° 2. Las sustituciones se denominan en la presente memoria mediante el código de aminoácido de una letra seguido de la posición de aminoácido en IL-2 seguido del código de aminoácido de una letra de sustitución, p.ej., K35A es una sustitución del residuo de lisina en la posición 35 de la SEC ID n° 2 por un residuo de alanina.

#### Muteínas de IL-2

En la presente memoria se proporcionan muteínas de IL-2 humana que estimulan preferentemente las células T reguladoras (Treg). Tal como se utiliza en la presente memoria, "preferentemente estimula células T reguladoras" se refiere a que la muteína estimula la proliferación, supervivencia, activación y/o función de las células T CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> con preferencia a las células T CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup>. Los métodos para medir la capacidad de estimular preferentemente las Treg pueden medirse mediante citometría de flujo de leucocitos de sangre periférica, en la que se produce un incremento observado del porcentaje de células T FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de entre las células T CD4<sup>+</sup> totales, un incremento del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> de entre las células T CD8<sup>+</sup> totales, un incremento del porcentaje de las células T FOXP3<sup>+</sup> respecto a las células NK, y/o un mayor incremento del nivel de expresión de CD25 sobre la superficie de las células T FOXP3<sup>+</sup> respecto al incremento de la expresión de CD25 sobre otras células T. El crecimiento preferente de las células Treg también puede detectarse como una representación incrementada de ADN promotor FOXP3 desmetilado (es decir, la región desmetilada específica de Treg, o RDET) respecto a los genes de CD3 desmetilados en el ADN extraído de sangre completa, tal como se detecta mediante secuenciación de los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de ADN genómico tratado con bisulfito (J. Sehouli et al., *Epigenetics* 6:2, 236-246, 2011).

Las muteínas de IL-2 que estimulan preferentemente las células Treg incrementan la proporción de células T CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> respecto a las células T CD3<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> en un sujeto o en una muestra de sangre periférica por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 150%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400%, por lo menos 500%, por lo menos 600%, por lo menos 700%, por lo menos 800%, por lo menos 900% o por lo menos 1000%.

Entre las muteínas de IL-2 preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las muteínas de IL-2 que comprenden una sustitución de V91K o N88D en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID n° 2. Se indica una muteína de

IL-2 ejemplar en la SEC ID nº 1. Resulta particularmente preferente la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1 que comprende una sustitución C125A. Aunque puede resultar ventajoso reducir el número de mutaciones adicionales a la secuencia de IL-2 de tipo salvaje, la invención incluye muteínas de IL-2 que presentan truncados o inserciones, deleciones o sustituciones adicionales además de la sustitución V91K o N88D, con la condición de que dichas muteínas mantengan la actividad de estimulación preferente de Treg. De esta manera, la exposición incluye muteínas de IL-2 que estimulan preferentemente las células Treg y comprenden una secuencia de aminoácidos que presenta un V91K o N88D que es por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 2. En una exposición particularmente preferente, dichas muteínas de IL-2 comprenden una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 2.

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

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones por parejas progresivas. También puede representar gráficamente las relaciones de agrupación utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360, 1987; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989. Son parámetros de PILEUP útiles, el peso de hueco por defecto de 3,00, el peso de longitud de hueco por defecto de 0,10 y los huecos terminales ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997 y Karin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787, 1993. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2, que se obtuvo de Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480, 1996. WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se fijan en los valores por defecto. Los parámetros ajustables se fijaron con los valores siguientes: espacio de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral de palabra (T)=II. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son fijados por el programa mismo dependiendo de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos particular en la que se está buscando la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para incrementar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es el BLAST con huecos ('gapped'), tal como se informa en Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1993. Gapped BLAST utiliza puntuaciones de sustitución de BLOSUM-62; el parámetro T umbral fijado en 9; el método de dos aciertos para iniciar extensiones sin huecos, carga longitudes de hueco de k un coste de 10+k;  $X_u$  fijado en 16, y  $X_g$  fijado en 40 para estadio de búsqueda en la base de datos y en 67 para el estadio de salida de los algoritmos. Las alineaciones con huecos se activan con una puntuación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

Aunque el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos puede estar predeterminada, la mutación de por sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y la muteína de IL-2 expresada cribarse para la combinación óptima de actividades deseadas. Las técnicas para producir mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que presenta una secuencia conocida son bien conocidas; por ejemplo, la mutagénesis de cebador M13 y la mutagénesis por PCR. El cribado de los mutantes puede llevarse a cabo utilizando ensayos descritos en la presente memoria, por ejemplo.

Las sustituciones de aminoácidos típicamente son residuos individuales; las inserciones habitualmente serán del orden de entre aproximadamente (1) y aproximadamente veinte (20) residuos aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente más grandes. Las deleciones son de entre aproximadamente un (1) y aproximadamente veinte (20) residuos aminoácidos, aunque en algunos casos las deleciones pueden ser mucho más grandes.

Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de los mismos pueden utilizarse para llegar a un derivado o variante final. Generalmente, estos cambios se llevan a cabo en unos cuantos aminoácidos para minimizar

la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y la especificidad de la proteína de unión a antígeno. Sin embargo, pueden tolerarse cambios más grandes bajo determinadas circunstancias. Las sustituciones conservadoras generalmente se llevan a cabo de acuerdo con el gráfico siguiente, ilustrado como Tabla 1.

5

Tabla 1

Residuo 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

Se llevan a cabo cambios sustanciales de función o identidad inmunológica mediante la selección de sustituciones que son menos conservadoras que las mostradas en la Tabla 1. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo sustituciones que afectan más significativamente: la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de la alteración, por ejemplo la estructura alfa-helicoidal o de lámina beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que, en general, se espera que produzcan los mayor cambios en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que: (a) un residuo hidrofílico, p.ej., serilo o treonilo, se sustituye por un residuo hidrofóbico, p.ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valinilo o alanilo, (b) una cisteína o prolina se sustituye por cualquier otro residuo, (c) un residuo que presenta una cadena lateral electropositiva, p.ej., lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por un residuo electronegativo, p.ej., glutamilo o aspartilo, o (d) un residuo que presenta una cadena lateral voluminosa, p.ej., fenilalanina, se sustituye por uno que no presenta una cadena lateral, p.ej., glicina.

Las variantes típicamente muestran la misma actividad biológica cualitativa e inducirán la misma respuesta inmunológica que el análogo natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de la muteína de IL-2, según se requiera. Alternativamente, la variante puede diseñarse de manera que se altera la actividad biológica de la muteína de IL-2. Por ejemplo, pueden alterarse o eliminarse sitios de glucosilación tal como se comenta en la presente memoria.

#### 25 Muteínas de IL-2 que presentan una semivida en suero prolongada

Debido a que las muteínas de IL-2 proporcionadas en la presente memoria preferentemente expanden Treg a, por ejemplo, las células Teff o NK, se espera que el perfil de seguridad, al administrarlas en un paciente, diferirán de la IL-2 de tipo salvaje o de PROLEUKIN® (aldesleuquina; Novartis, Basel, Suiza). Entre los efectos secundarios asociados a la IL-2 de tipo salvaje o PROLEUKIN® se incluyen síntomas de tipo gripe, escalofríos/rigidez, artralgia, fiebre, erupciones, prurito, reacciones en el sitio de inyección, hipotensión, diarrea, náusea, ansiedad, confusión y depresión. Las muteínas de IL-2 proporcionadas en la presente memoria pueden alterarse para incluir o fusionarse con moléculas que prolongan la semivida en suero de la muteína sin incrementar el riesgo de que dicha extensión de la semivida incremente la probabilidad o la intensidad de un efecto secundario o suceso adverso en un paciente. La administración subcutánea de dicha muteína de semivida en suero prolongada puede permitir una cobertura de la diana prolongada con una exposición sistémica máxima ( $C_{max}$ ) más baja. La semivida en suero prolongada puede permitir un régimen de administración inferior o menos frecuente de la muteína.

La semivida en suero de las muteínas de IL-2 proporcionadas en la presente memoria pueden prolongarse mediante esencialmente cualquier método conocido de la técnica. Entre dichos métodos se incluyen la alteración de la secuencia de la muteína de IL-2 para que incluya un péptido que se une al receptor de Fc $\gamma$  neonatal o se une a una proteína que presente una semivida en suero prolongada, p.ej., IgG o albúmina de suero humano. En otras realizaciones, la muteína de IL-2 se fusiona con un polipéptido que confiere una semivida prolongada a la molécula de fusión. Entre dichos polipéptidos se incluyen un Fc de IgG u otros polipéptidos que se unen al receptor de Fc $\gamma$  neonatal, albúmina de suero

humano o polipéptidos que se unen a una proteína que presenta una semivida en suero prolongada. En realizaciones preferentes, la muteína de IL-2 se fusiona con una molécula de Fc de IgG.

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

10 Una realización de la presente invención se refiere a un dímero que comprende dos polipéptidos de fusión de Fc creados mediante la fusión de una muteína de IL-2 con la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede producirse mediante, por ejemplo, la inserción de una fusión génica codificante de la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, que expresa la fusión génica en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante y permitir que las proteínas de fusión expresada se ensamblen de manera muy similar a las moléculas de anticuerpo, de manera que se forman enlaces entre cadenas entre las fracciones de Fc, rindiendo el dímero.

15 La expresión "polipéptido Fc" o "región Fc" tal como se utiliza en la presente memoria incluye formas nativas y de muteína de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. Las formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que estimula la dimerización también se encuentran incluidas. En determinadas exposiciones, la región Fc comprende dominios CH2 y CH3 de anticuerpo. Junto con una semivida en suero prolongada, las proteínas de fusión que comprenden fracciones Fc (y oligómeros formados a partir de las mismas) ofrecen la ventaja de una fácil purificación mediante cromatografía de afinidad respecto a las columnas de proteína A o de proteína G. Las regiones Fc preferentes se derivan de IgG humana, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En la presente memoria, los residuos específicos dentro de Fc se identifican por la posición. Todas las posiciones en Fc se basan en el esquema de numeración EU.

25 Una de las funciones de la parte Fc de un anticuerpo es comunicarse con el sistema inmunológico al unirse el anticuerpo a su diana. Esto se considera la "función efectora". La comunicación conduce a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La ADCC y la ADCP están mediadas por la unión del Fc a receptores de Fc sobre la superficie de las células del sistema inmunológico. La CDC está mediada por la unión del Fc a proteínas del sistema del complemento, p.ej., C1q.

35 Las subclases de IgG varían en su capacidad de mediar en funciones efectoras. Por ejemplo, IgG1 es muy superior a IgG2 e IgG4 en la mediación de la ADCC y la CDC. De esta manera, en el caso de que la función efectora no resulte deseable, resultaría preferente un Fc de IgG2. Las moléculas que contienen Fc de IgG2, sin embargo, es conocido que resultan más difíciles de producir y presentan propiedades biológicas menos atractivas, tales como una semivida más corta, en comparación con las moléculas que contienen Fc de IgG1.

40 La función efectora de un anticuerpo puede incrementarse o reducirse mediante la introducción de una o más mutaciones en Fc. Entre las realizaciones de la invención se incluyen proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc que presentan un Fc manipulado para incrementar la función efectora (patente US n° 7.317.091 y Strohl, Curr. Opin. Biotech. 20:685-691, 2009). Entre las moléculas de Fc de IgG1 ejemplares que presentan una función efectora incrementada se incluyen la que presentan las sustituciones siguientes:

- 45 S239D/I332E  
S239D/A330S/I332E  
S239D/A330L/I332E  
S298A/D333A/K334A  
P247I/A339D  
P247I/A339Q  
50 D280H/K290S  
D280H/K290S/S298D  
D280H/K290S/S298V  
F243L/R292P/Y300L  
F243L/R292P/Y300L/P396L  
55 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L  
G236A/S239D/I332E  
K326A/E333A  
K326W/E333S  
K290E/S298G/T299A  
60 K290N/S298G/T299A  
K290E/S298G/T299A/K326E  
K290N/S298G/T299A/K326E

65 Otro método para incrementar la función efectora de las proteínas que contienen Fc de IgG es la reducción de la fucosilación de Fc. La eliminación de la fucosa nuclear de los oligosacáridos de tipo complejo biantenarias unidas a Fc incrementa mucho la función efectora de ADCC sin alterar la unión de antígeno o la función efectora de CDC. Se

conocen varias maneras para reducir o anular la fucosilación de las moléculas que contienen Fc, p.ej., anticuerpos. Entre ellas se incluyen la expresión recombinante en determinadas líneas celulares de mamífero, incluyendo una línea celular con inactivación FUT8, la línea CHO variante Lec13, la línea celular de hibridoma de rata YB2/0, una línea celular que comprende un ARN interfiriente pequeño específicamente contra el gen FUT8, y una línea celular que coexpresa  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferasa III y  $\alpha$ -manosidasa II del Golgi. Alternativamente, la molécula que contiene Fc puede expresarse en una célula no de mamífero, tal como una célula vegetal, de levadura o célula procariontaria, p.ej., de *E. coli*.

En realizaciones preferentes de la invención, las proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc comprenden un Fc manipulado para reducir la función efectora. Entre las moléculas de Fc ejemplares que presentan una función efectora reducida se incluyen la que presentan las sustituciones siguientes:

N297A o N297Q (IgG1)  
 L234A/L235A (IgG1)  
 V234A/G237A (IgG2)  
 L235A/G237A/E318A (IgG4)  
 H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)  
 C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)  
 C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)  
 L234F/L235E/P331S (IgG1)  
 S267E/L328F (IgG1)

Es conocido que la IgG1 humana presenta un sitio de glucosilación en N297 (sistema de numeración EU) y la glucosilación contribuye a la función efectora de los anticuerpos IgG1. Se proporciona una secuencia de IgG1 ejemplar en la SEC ID nº 3. Los grupos presentan N297 mutado en un esfuerzo por producir anticuerpos aglucosilados. Las mutaciones se centran en la sustitución de N297 por aminoácidos que son similares a la asparagina en su naturaleza físicoquímica, tal como la glutamina (N297Q) o con alanina (N297A) que imita las asparaginas sin grupos polares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo aglucosilado" o "Fc aglucosilado" se refiere al estado de glucosilación del residuo en la posición 297 de Fc. Un anticuerpo u otra molécula puede contener glucosilación en otra u otras localizaciones, pero todavía considerarse un anticuerpo aglucosilado o proteína de fusión de Fc aglucosilada.

En un esfuerzo por producir un Fc de IgG1 sin función efectora, se ha encontrado que la mutación de aminoácido N297 de la IgG1 humana a glicina, es decir, N297G, proporciona una eficiencia de purificación y propiedades biofísicas muy superiores que otras sustituciones de aminoácido en ese residuo. Ver el Ejemplo 8. De esta manera, en realizaciones preferentes, la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc comprende un Fc de IgG1 humana que presenta una sustitución de N297G. El Fc que comprende la sustitución N297G resulta útil en cualquier contexto en el que una molécula comprende un Fc de IgG1 humano y no se encuentra limitado a la utilización en el contexto de una fusión de muteína de IL-2-Fc. Un anticuerpo puede comprender el Fc que presenta una sustitución N297G.

Un Fc que comprende un Fc de IgG1 humana que presenta la mutación N297G puede comprender además inserciones, deleciones y sustituciones adicionales. El Fc de IgG1 humana puede comprender la sustitución N297G y es por lo menos 90%, por lo menos 91% idéntico, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 3. En una realización particularmente preferente, el residuo de lisina C-terminal se sustituye o se deleciona. La secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana que comprende la sustitución y delección N297G de la lisina C-terminal se indica en la SEC ID nº 4.

Se mostró que una molécula que contenía Fc de IgG1 aglucosilada era menos estable que las moléculas que contenía Fc de IgG1 glucosiladas. La región Fc puede manipularse adicionalmente para incrementar la estabilidad de la molécula aglucosilada. En algunas exposiciones, se sustituyen uno o más aminoácidos por cisteína de manera que se forman enlaces disulfuro en el estado dimerico. Los residuos V259, A287, R292, V302, L306, V323, o I332 de la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 3 se sustituyen por cisteína. En exposiciones preferentes, son parejas específicas de residuos sustituciones que forman preferentemente un enlace disulfuro entre sí, limitando o impidiendo de esta manera el intercambio de enlaces disulfuro. En las parejas preferentes se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, A287C y L306C, V259C y L306C, R292C y V302C, y V323C y I332C.

En la presente memoria se proporcionan moléculas que contienen Fc, en la que uno o más residuos V259, A287, R292, V302, L306, V323, o I332 se sustituyen por cisteína. Entre las moléculas que contienen Fc preferentes se incluyen aquellos que comprenden las sustituciones A287C y L306C, V259C y L306C, R292C y V302C, o V323C y I332C.

Entre las mutaciones adicionales que pueden realizarse en Fc de IgG1 se incluyen las que facilitan la formación de heterodímero entre los polipéptidos que contienen Fc. En algunas exposiciones, la región Fc se manipula para crear "botones" y "ojales" que facilitan la formación de heterodímero de dos cadenas polipeptídicas que contienen Fc diferentes al coexpresarse en una célula (patente US nº 7.695.963). En otras exposiciones, la región Fc se altera para

utilizar la orientación electrostática para estimular la formación de heterodímeros, desincentivando la formación de homodímeros de dos polipéptidos que contienen Fc diferentes al coexpresarse en una célula (documento nº WO 09/089.004). Entre los Fc heterodiméricos preferentes se incluyen aquellos en los que una cadena de Fc comprende las sustituciones D399K y E356K y la otra cadena de Fc comprende las sustituciones K409D y K392D. En otras exposiciones, una cadena de Fc comprende las sustituciones D399K, E356K y E357K y la otra cadena de Fc comprende las sustituciones K409D, K392D y K370D.

En determinadas realizaciones, puede resultar ventajoso para la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc ser monomérica, es decir, contener únicamente una única molécula de muteína de IL-2. La región Fc de la proteína de fusión puede contener una o más mutaciones que facilitan la formación de heterodímero. La proteína de fusión se coexpresa con una región Fc que presenta mutaciones recíprocas a las presentes en el polipéptido de fusión de muteína de IL-2-Fc pero que no presenta una muteína de IL-2. En el caso de que se forme el heterodímero de los dos polipéptidos que contienen Fc, la proteína resultante comprende únicamente una sola muteína de IL-2.

Otro método para crear una proteína de fusión monomérica de muteína de IL-2-Fc es fusionar la muteína de IL-2 con un Fc monomérico, es decir, una región Fc que no se dimeriza. Los Fc monoméricos estables comprenden mutaciones que desincentivan la dimerización y que estabilizan la molécula en la forma monomérica. Los Fc monoméricos preferentes se dan a conocer en el documento nº WO 2011/063348. Las proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc comprenden un Fc que comprende aminoácidos cargados negativamente en las posiciones 392 y 409 junto con una sustitución de tREonina en Y349, L351, L368, V397, L398, F405 o Y407.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc comprende un conector entre Fc y la muteína de IL-2. Muchos polipéptidos conectores diferentes son conocidos de la técnica y pueden utilizarse en el contexto de una proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. En realizaciones preferentes, la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc comprende una o más copias de un péptido que consiste en GGGGS (SEC ID nº 5), GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº 7) entre el Fc y la muteína de IL-2. En algunas realizaciones, la región del polipéptido entre la región Fc y la región de muteína de IL-2 comprende una única copia de GGGGS (SEC ID nº 5), GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº 7). Tal como se muestra en la presente memoria, los conectores GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº 7) están glucosilados al expresarse en las células apropiadas y dicha glucosilación puede ayudar a estabilizar la proteína en solución y/o al administrarse *in vivo*. De esta manera, en determinadas realizaciones, una proteína de fusión de muteína de IL-2 comprende un conector glucosilado entre la región Fc y la región de muteína de IL-2.

Se encuentra contemplado que el conector glucosilado pueda resultar útil al introducirlo en el contexto de un polipéptido. En la presente memoria 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 sustituyendo uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. En exposiciones preferentes, se inserta GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº Y) en un bucle de la estructura terciaria del polipéptido. En otras exposiciones, uno o más aminoácidos de un bucle se sustituyen por GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº 7).

La parte C-terminal de Fc y/o la parte aminoterminal de la muteína de IL-2 puede contener una o más mutaciones que alteran el perfil de glucosilación de la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc al expresarse en células de mamífero. En determinadas realizaciones, la muteína de IL-2 comprende además una sustitución T3, p.ej., T3N o T3A. La muteína de IL-2 puede comprender además una sustitución S5, tal como S5T.

Las modificaciones covalentes de la muteína de IL-2 y de las proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc se encuentran incluidas dentro del alcance de la presente invención y se llevan a cabo generalmente, aunque no siempre, post-traduccionalmente. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc en la molécula mediante la reacción de residuos aminoácidos específicos de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N-terminales o C-terminales.

Los residuos cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con  $\alpha$ -haloacetatos (y amins correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, proporcionando carboximetilo o derivados carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilos también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos histidilo se derivatizan mediante reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también resulta útil; la reacción se lleva a cabo preferentemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos lisinilo y aminoterminal se hacen reaccionar con anhídrido de ácido succínico o de otros ácidos carboxílicos. La derivatización con dichos agentes presenta el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Entre otros agentes adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino se incluyen imidoésteres, tales como

picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborhidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos arginilo se modifican mediante la reacción con uno o más reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de los residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo bajo condiciones alcalinas debido al elevado  $pK_a$  del grupo funcional guanidina. Además, dichos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como el grupo amino epsilon de las argininas.

Puede llevarse a cabo la modificación específica de los residuos tirosilo, con interés particular en la introducción de marcajes espectrales en los residuos tirosilo mediante reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente, se utiliza N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetil-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodan utilizando  $^{125}I$  y  $^{131}I$  para preparar proteínas marcadas para la utilización en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T indicado anteriormente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ( $R'-N=C=N-R'$ ), donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil para el entrecruzamiento de proteínas de unión a antígeno con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para la utilización en una diversidad de métodos. Entre los agentes de entrecruzamiento utilizados comúnmente se incluyen, p.ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con 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 rinden intermediarios fotoactivables que son capaces formar enlaces cruzados en presencia de luz. Alternativamente, se utilizan matrices insolubles en agua reactivas, tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes US nº 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537, y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

Los residuos glutaminilo y asparaginilo con frecuencia se desamidán en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Alternativamente, dichos residuos se desamidán bajo condiciones suavemente ácidas. Cualquiera de las formas de estos residuos se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención.

Entre otras modificaciones se incluyen la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc incluidos dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación de la proteína. Tal como es conocido de la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (p.ej., la presencia o ausencia de residuos aminoácidos de glucosilación particulares, comentados posteriormente) como de la célula u organismo huésped en el que se produce la proteína. Se comentan posteriormente sistemas de expresión particulares.

La glucosilación de los polipéptidos típicamente se encuentra ligada a N o ligada a O. La expresión "ligada a N" se refiere a la unión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido 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 grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de dichas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de unos de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse la 5-hidroxi prolina o la 5-hidroxi lisina.

La adición de sitios de glucosilación a la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc puede llevarse a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente indicadas (para los sitios de glucosilación N-ligada). La alteración también puede llevarse a cabo mediante la adición o la sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia inicial (para los sitios de glucosilación ligados a O). Por facilidad, la secuencia de aminoácidos de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc preferentemente se altera mediante cambios al nivel del ADN, particularmente mediante la mutación del ADN codificante del polipéptido diana en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de incrementar el número de fracciones carbohidrato en la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína

de IL-2-Fc es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos resultan ventajosos en el aspecto de que no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que presenta capacidades de glucosilación para la glucosilación ligada a N o a O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de las cisteínas, (d) grupos hidroxilo libres, tales como las de la serina, la treonina o la hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento n° WO 87/05330, publicado el 11 de sept., 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259 a 306, 1981.

La eliminación de fracciones carbohidrato presentes en la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc inicial puede llevarse a cabo química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en el corte de la mayoría o todos los sacáridos excepto el sacárido de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el polipéptido. La desglucosilación química se describe en Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259:52, 1987 y por Edge et al., Anal. Biochem. 118:131, 1982. El corte enzimático de las fracciones carbohidrato en los polipéptidos puede llevarse a cabo mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas tal como describen Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138:350, 1982. La glucosilación en potenciales sitios de glucosilación puede impedirse mediante la utilización del compuesto tunicamicina, tal como se describe en Duskin et al., J. Biol. Chem. 257:3105, 1982. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces de proteína-N-glucósido.

Otro tipo de modificación covalente de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc comprende unir la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc a diversos polímeros no proteicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, diversos polioles, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera explicada en las patentes US n° 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 o 4.179.337. Además, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc para facilitar la adición de polímeros, tales como PEG. De esta manera, entre las realizaciones de la invención pueden incluirse muteínas de IL-2 PEGiladas y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc PEGiladas. Tales proteínas PEGiladas pueden presentar una semivida incrementada y/o una inmunogenicidad reducida respecto a las proteínas no PEGiladas.

#### Polinucleótidos codificantes de muteínas de IL-2 y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc

Comprendidos dentro de la invención están los ácidos nucleicos codificantes de muteínas de IL-2 y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc. Entre los aspectos de la invención pueden incluirse variantes de polinucleótido (p.ej., debido a la degeneración) que codifican las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente memoria. El polipéptido codificado por el ácido nucleico aislado puede ser un componente de una proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc.

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente memoria, destinadas a ser utilizadas como sondas o cebadores para el aislamiento de ácidos nucleicos o como secuencias de pregunta para búsquedas en bases de datos, pueden obtenerse mediante "retro-traducción" a partir de las secuencias de aminoácidos. El bien conocido procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede utilizarse para aislar y amplificar una secuencia de ADN codificante de muteínas de IL-2 y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc. Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados de la combinación de fragmentos de ADN se utilizan como cebadores 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. Las técnicas de PCR se describen en Saiki et al., Science 239:487, 1988; Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego, pp. 189-196, 1989; y PCR Protocols:

A Guide to Methods and Applications, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990). A Guide to Methods and Applications, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Entre las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se incluye ADN y ARN en forma tanto de cadena sencilla como de doble cadena, así como las secuencias complementarias correspondientes. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que ha sido separado de secuencias genéticas contiguas presentes en el genoma del organismo a partir del cual se ha aislado el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes naturales. En el caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente a partir de un molde o químicamente, tal como productos de PCR, moléculas de ADN o oligonucleótidos, por ejemplo, se entiende que los ácidos nucleicos que resultan de dichos procedimientos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula aislada de ácidos nucleicos se refiere a una molécula de ácidos nucleicos en forma de un fragmento separado o como un componente de un constructo de ácido nucleico de mayor tamaño. En una exposición preferente, los ácidos nucleicos se encuentran sustancialmente libres de material endógeno contaminante. La molécula de ácidos nucleicos preferentemente se ha derivado de ADN o ARN aislado por lo menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de sus secuencias de nucleótidos componentes mediante métodos bioquímicos estándares (tales como los descritos de manera general en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Tales secuencias se proporcionan y/o construyen preferentemente en forma de un marco de lectura abierto no interrumpido por secuencias no traducidas

internas, o intrones, típicamente presentes en los genes eucarióticos. Las secuencias de ADN no traducido pueden encontrarse presentes 5' o 3' respecto a un marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

5 Las variantes según la invención se preparan ordinariamente mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN codificante de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc, utilizando mutagénesis por inserción de casete o por PCR u otras técnicas bien conocidas, para producir ADN codificante de la variante, expresando después el ADN recombinante en cultivo celular tal como se describe de manera general en la presente memoria. Sin embargo, las muteínas de IL-2 y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc pueden prepararse mediante  
10 síntesis *in vitro* utilizando técnicas establecidas. Las variantes típicamente muestran la misma actividad biológica cualitativa que el análogo natural, p.ej., la expansión de las Treg, aunque también pueden seleccionarse variantes que presentan características modificadas, tal como se describe de manera general más completamente después.

15 Tal como apreciará el experto en la materia, debido a la degeneración del código genético, puede prepararse un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, la totalidad de los cuales codifica muteínas de IL-2 y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc de la presente invención. De esta manera, tras identificar una secuencia de aminoácidos particular, el experto en la materia podría producir cualquier número de ácidos nucleicos diferentes, mediante simplemente la modificación de la secuencia de uno o más codones de una manera que no modifica la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

20 La presente invención proporciona además sistemas de expresión y constructos en forma de plásmidos, vectores de expresión, casetes de transcripción o expresión que comprenden por lo menos un polinucleótido tal como anteriormente. Además, la invención proporciona células huésped que comprenden dichos sistemas de expresión o constructos.

25 Típicamente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, colectivamente denominadas "secuencias flanqueantes" en determinadas exposiciones típicamente incluirán una o más de las secuencias de nucleótidos siguientes: un promotor, una o más secuencias de intensificador, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y uno aceptor, una secuencia codificante de una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión ribosómica, una secuencia de poliadenilación, una región de policonector para insertar el ácido nucleico codificante del polipéptido que debe expresarse, y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se comenta posteriormente.

35 Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "etiqueta", es decir, una molécula oligonucleótida situada en el extremo 5' o 3' de las muteínas de IL-2, o una secuencia codificante de proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc, la secuencia oligonucleótida codifica poliHis (tal como hexaHis (SEC ID nº 21)) u otra "etiqueta", tal como FLAG HA (virus influenza hemaglutinina), o *myc*, para el que existen anticuerpos disponibles comercialmente.  
40 Esta etiqueta típicamente se fusiona con el polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como medio para la purificación por afinidad o la detección de la muteína de IL-2 de la célula huésped. La purificación por afinidad puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante cromatografía de columna utilizando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente de las muteínas de IL-2 y proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc purificadas por diversos medios, tales como la utilización de determinadas peptidasas para el corte.  
45

50 Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie diferente de la especie o cepa de la célula huésped), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. De esta manera, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, con la condición de que la secuencia flanqueante sea funcional y pueda activarse en la maquinaria de la célula huésped.

55 Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de la presente invención pueden obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos de la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en la presente memoria previamente habrán sido identificadas mediante mapeado y/o mediante digestión con endonucleasa de restricción y, de esta manera, pueden aislarse a partir de la fuente tisular apropiada utilizando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante puede ser conocida. En la presente memoria, la secuencia flanqueante puede sintetizarse utilizando los métodos descritos  
60 en la presente memoria para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

65 Se conozca o no la totalidad o sólo una parte de la secuencia flanqueante, puede obtenerse utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o mediante cribado de una biblioteca genómica con una sonda adecuada, tal como un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante de la misma especie o de otra especie. En el caso de que no se conozca la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante a partir de un segmento más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso

otro gen o genes. El aislamiento puede llevarse a cabo mediante digestión con endonucleasa de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado, seguido de aislamiento utilizando la purificación en gel de agarosa, cromatografía de columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto en la materia. La selección de enzimas adecuados para llevar a cabo este propósito resultará fácilmente evidente para el experto ordinario en la materia.

Un origen de replicación es típicamente una parte de dichos vectores de expresión procarióticos adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. En el caso de que el vector de elección no contenga un sitio origen de replicación, puede sintetizarse químicamente basándose en una secuencia conocida y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) resulta adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas y diversos orígenes víricos (p.ej., SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus, tal como HPV o BPV) resultan útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente origen de replicación no resulta necesario para los vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen de SV40 se utiliza con frecuencia porque también contiene el promotor temprano vírico).

Una secuencia de terminación de transcripción típicamente se localiza 3' respecto al extremo de una región codificante polipeptídica y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de transcripción en células procarióticas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente utilizando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos, tales como los indicados en la presente memoria.

Un gen de marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, p.ej., ampicilina, tetraciclina o canamicina para las células huésped procarióticas, (b) deficiencias auxotróficas del complemento de la célula, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponibles de medios complejos o definidos. Son marcadores seleccionables específicos, el gen de resistencia a canamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. Ventajosamente, también puede utilizarse un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped tanto procarióticas como eucarióticas.

Pueden utilizarse otros genes seleccionables para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el procedimiento en el que los genes que resultan necesarios 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. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero se incluyen la dihidrofolato reductasa (DHFR) y los genes de timidina quinasa sin promotor. Se sitúan transformantes de células de mamífero bajo presión selectiva, en la que sólo los transformantes están adaptadas únicamente a la supervivencia en virtud del gen seleccionable presente en el vector. Se impone una presión selectiva mediante el cultivo de las células transformadas bajo condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se incrementa sucesivamente, conduciendo de esta manera a la amplificación de tanto el gen seleccionable como el ADN que codifica otro gen, tal como una muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. Como resultado, se sintetizan cantidades incrementadas de un polipéptido, tal como una muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc, a partir del ADN amplificado.

Habitualmente resulta necesario un sitio de unión ribosómica para el inicio de traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento se localiza típicamente 3' respecto al promotor y 5' respecto a la secuencia codificante del polipéptido que debe expresarse. En determinadas exposiciones, pueden ligarse operablemente una o más regiones codificantes a un sitio interno de unión ribosómica (IRES, por sus siglas en inglés), permitiendo la traducción de dos marcos de lectura abiertos a partir de un único transcrito de ARN.

En algunos casos, tal como donde se desea la glucosilación en un sistema de expresión de células huésped eucariótica, pueden manipularse las diversas presencias o proyecciones para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de corte de peptidasa de un péptido de señal particular, o añadir proyecciones, las cuales también pueden afectar a la glucosilación. El producto proteína final puede presentar, en la posición -1 (respecto al primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales incidentes a la expresión, que pueden no haber sido totalmente eliminados. Por ejemplo, el producto proteína final puede presentar uno o dos residuos aminoácidos presentes en el sitio de corte de peptidasa, unido al extremo aminoterminal. Alternativamente, la utilización de algunos sitios de corte enzimático puede resultar en una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, en el caso de que el enzima corte en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión y clonación de la invención típicamente contendrán un promotor que resulta reconocido por el organismo huésped y se encuentra operablemente ligado a la molécula codificante de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. Los promotores son secuencias no transcritas situadas cadena arriba (es decir, 5') respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente a aproximadamente 100 a 1000 pb) que controla la

transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convenientemente en dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles incrementados de transcripción a partir 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 de temperatura. Los promotores constitutivos, por otra parte, transcriben uniformemente el gen al que se encuentran operablemente ligados, es decir, con poco o ningún control de la expresión génica. Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por una diversidad de potenciales células huésped.

Los promotores adecuados para la utilización con huéspedes levaduras también son bien conocidos de la técnica. Los intensificadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para la utilización con células huésped de mamífero son bien conocidos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferentemente el virus 40 del simio (SV40). Entre otros promotores de mamífero adecuados se incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor actina.

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

Puede insertarse una secuencia intensificadora en el vector para incrementar la transcripción en eucariotas superiores. Los intensificadores son elementos de acción en cis de ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor, incrementando la transcripción. Los intensificadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, ya que se han encontrado en posiciones orientadas tanto 5' como 3' respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias de intensificador disponibles de genes de mamífero (p.ej., globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se utiliza un intensificador de un virus. El intensificador de SV40, el intensificador de promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador de poliovirus, y los intensificadores de adenovirus conocidos de la técnica son elementos intensificadores ejemplares para la activación de los promotores eucarióticos. Aunque un intensificador puede situarse en el vector 5' o 3' respecto a una secuencia codificante, típicamente se localiza en un sitio 5' respecto al promotor. Una secuencia codificante de una secuencia de señal nativa o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido de señal) puede incorporarse en un vector de expresión, estimulando la secreción extracelular de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. La elección de péptido de señal o líder depende del tipo de células huésped en las que debe producirse la proteína, y una secuencia de señal heteróloga puede sustituir la secuencia de señal nativa. Entre los ejemplos de péptidos de señal que son funcionales en las células huésped mamífero se incluyen los siguientes: la secuencia de señal para la interleuquina-7 (IL-7) indicada en la patente US nº 4.965.195; la secuencia de señal para el receptor de interleuquina-2 indicado en Cosman et al., *Nature* 312:768, 1984; el péptido de señal de receptor de interleuquina-4 indicado en la patente EP nº 0367.566; el péptido de señal de receptor de interleuquina-1 de tipo I indicado en la patente US nº 4.968.607; el péptido de señal de receptor de interleuquina-1 de tipo II indicado en la patente EP nº 0 460 846.

El vector puede contener uno o más elementos que facilitan la expresión al integrar el vector en el genoma de la célula huésped. Entre los ejemplos se incluyen un elemento EASE (Aldrich et al., *Biotechnol. Prog.* 19:1433-38, 2003) y una región de unión a matriz (RUM). Las RUM median en la organización estructural de la cromatina y pueden aislar el vector integrado del efecto "posición". De esta manera, las RUM resultan particularmente útiles en el caso de que se

utilice el vector para crear transfectantes estables. Se conocen de la técnica varios ácidos nucleicos naturales y sintéticos que contienen RUM, p.ej., las patentes US nº 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.

5 Pueden construirse vectores de expresión de la invención a partir de un vector inicial, tal como un vector disponible comercialmente. Tales vectores pueden contener o no la totalidad de las secuencias flanqueantes deseadas. En el caso de que una o más de las secuencias flanqueantes indicadas en la presente memoria no se encuentre ya presente en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Los métodos utilizados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos por el experto en la materia.

10 Tras construir el vector e insertar una molécula de ácidos nucleicos codificante de una muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc en el sitio apropiado del vector, el vector completo puede insertarse en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión en una célula huésped seleccionada puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos, incluyendo la transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que deba utilizarse. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la materia y se explican en, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, 2001.

15 Una célula huésped, al cultivarla bajo condiciones apropiadas, sintetiza una muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (en el caso de que la célula huésped la secrete al medio) o directamente a partir de la célula huésped que la produce (en caso de que no la secrete). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles deseados de expresión, las modificaciones polipeptídicas que resultan deseables o necesarias para la actividad (tal como glucosilación o fosforilación) y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa. La célula huésped puede ser eucariótica o procariótica.

20 Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas de la técnica y entre ellas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, líneas celulares inmortalizadas de la American Type Culture Collection (ATCC) y pueden utilizarse cualesquiera líneas celulares utilizadas en un sistema de expresión conocido de la técnica para producir los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, las células huésped se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN codificante de una muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc deseada. Entre las células huésped que pueden utilizarse se encuentran las células procarióticas, las levaduras o las eucarióticas superiores. Entre los procariotas se incluyen los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Entre las células eucarióticas superiores se incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen de mamífero. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas se incluyen la línea COS-7 de células renales de mono (ATCC nº CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell* 23:175, 1981), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC nº CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados, tales como CHO Veggie y líneas celulares relacionadas que crecen en medio sin suero (Rasmussen et al., *Cytotechnology* 28: 31, 1998), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC nº CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular renal de mono verde africano CVI (ATCC nº CCL 70) tal como se indica en McMahan et al., *EMBO J.* 10: 2821, 1991, las células renales embrionarias humanas, tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, las células epidérmicas humanas A431, las células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Opcionalmente, pueden utilizarse líneas celulares de mamífero, tales como HepG2/3B, KB, NIH 3T<sup>-</sup> o S49, por ejemplo, para la expresión del polipéptido en el caso de que resulte deseable utilizar el polipéptido en diversos ensayos de transducción de señales o de informador.

25 Alternativamente, resulta posible producir el polipéptido en eucariotas inferiores, tales como levaduras, o en procariotas, tales como bacterias. Entre las levaduras adecuadas se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Entre las cepas bacterianas adecuadas se incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar polipéptidos heterólogos. En el caso de que el polipéptido se produzca en levaduras o bacterias, puede resultar deseable modificar el polipéptido producido en el mismo, por ejemplo mediante fosforilación o glucosilación de los sitios apropiados, con el fin de obtener el polipéptido funcional. Dichas uniones covalentes pueden llevarse a cabo utilizando métodos químicos o enzimáticos conocidos.

30 El polipéptido también puede producirse uniéndose operablemente el ácido nucleico aislado de la invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, y utilizando un sistema de expresión de insecto. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto se encuentran disponibles comercialmente en forma de kit de, p.ej., Invitrogen, San Diego, Calif., EE.UU. (el kit MaxBac® kit), y dichos métodos son bien conocidos de la técnica, tal como se describe en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* nº 1555 (1987), y Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47, 1988. Los sistemas de traducción libres de células también podrían utilizarse para producir polipéptidos utilizando ARN derivados de constructos de ácidos nucleicos dados a conocer en la presente memoria. Los vectores de clonación y expresión apropiados para la utilización con huéspedes bacterianos, fúngicos, de levadura y de células de mamífero se describen en Pouwels et al. (*Cloning*

*Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985). Una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado de la invención, preferentemente ligado operablemente a por lo menos una secuencia de control de la expresión, es una "célula huésped recombinante".

5 En determinados aspectos, la invención incluye un ácido nucleico aislado codificante de una muteína de IL-2 humana que estimula preferentemente células T reguladoras y comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o 100% idéntica a la  
10 secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1. El ácido nucleico aislado puede codificar cualquiera de las muteínas de IL-2 ejemplares proporcionadas en la presente memoria.

Se encuentran incluidos además ácidos nucleicos aislados codificantes de cualquiera de las proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc ejemplares indicadas en la presente memoria. En la exposición, la parte Fc de un anticuerpo y la muteína de IL-2 humana se encuentran codificadas en un único marco de lectura abierto, opcionalmente con un  
15 conector codificado entre la región Fc y la muteína de IL-2.

En otra exposición, en la presente memoria se proporcionan vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos codificantes de muteína de IL-2 o de proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc anteriormente indicados, operablemente ligados a un promotor.  
20

En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan células huésped que comprende los ácidos nucleicos aislados codificantes de las muteínas de IL-2 o proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc anteriormente indicados. La célula huésped puede ser una célula procariótica, tal como *E. coli*, o puede ser una célula eucariótica, tal como una célula de mamífero. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).  
25

En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos de producción de una muteína de IL-2 humana. Los métodos que comprenden cultivar una célula huésped bajo condiciones en las que se expresa un promotor operablemente ligado a una muteína de IL-2 HUMANA. A continuación, la muteína de IL-2 humana se recolecta a partir de dicho cultivo. La muteína de IL-2 puede recolectarse a partir del medio de cultivo y/o lisados de la célula huésped.  
30

En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos de preparación de una proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. Los métodos comprenden cultivar una célula huésped bajo condiciones en las que se expresa un promotor operablemente ligado a una proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. A continuación, se recolecta la proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc humana a partir de dicho cultivo. La proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc humana puede recolectarse del medio de cultivo y/o de lisados de la célula huésped.  
35

#### Composiciones farmacéuticas

40 En algunas exposiciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de IL-2 junto con un diluyente, portador, solubilizador, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente eficaz. En determinadas realizaciones, la muteína de IL-2 se encuentra dentro del contexto de una proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc. Entre las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.  
45

Preferentemente, los materiales de formulación resultan no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas. En exposiciones específicas, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula terapéutica que contiene muteína de IL-2, p.ej., una fusión de muteína de IL-2-Fc.  
50

En determinadas exposiciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolalidad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En tales exposiciones, entre los materiales de formulación adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrogenosulfito sódico), tampones (tales como borato, bicarbonato, citratos de Tris-HCl, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes de carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés)), agentes formadores de complejo (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos y otros  
55 carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas), agentes colorantes, saborizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrofílicos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sal (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), solventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, surfactantes o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como  
60 65

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 metal alcalino, preferentemente cloruro sódico o potásico, manitol, sorbitol), vehículo de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Ver REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18a edición (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinadas exposiciones, la composición farmacéutica óptima será determinada por el experto en la materia dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración, formato de administración y dosis deseados. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. En determinadas realizaciones, tales composiciones pueden influir sobre el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de lavado *in vivo* de las proteínas de unión a antígeno de la invención. En determinadas exposiciones, el vehículo primario o portador en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, el vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cerebrospinal artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para la administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos ejemplares adicionales. En exposiciones específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0 a 8,5 o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0 a 5,5, y puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En determinadas exposiciones de la invención, las composiciones de muteína de IL-2 pueden prepararse para el almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada que presenta el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, el producto de muteína de IL-2 puede formularse en forma de un liofilizado utilizando excipientes apropiados, tales como la sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para la administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para la inhalación o para la administración por el tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables se encuentra comprendida en los conocimientos del experto en la materia. Los componentes de la formulación se encuentran presentes preferentemente en concentraciones que resultan aceptables en el sitio de administración. En determinadas exposiciones, se utilizan tampones para mantener la composición a pH fisiológico a un pH ligeramente inferior, típicamente en un intervalo de pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8.

En el caso de que se contemple la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para la utilización en la presente invención pueden proporcionarse en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos que comprende la composición de muteína de IL-2 deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula la composición de muteína de IL-2 en forma de una solución isotónica estéril correctamente conservada. En determinadas exposiciones, 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 una liberación controlada o sostenida del producto, que puede administrarse mediante la inyección de depósito. En determinadas exposiciones, también puede utilizarse ácido hialurónico, que presenta el efecto de estimular una duración sostenida en la circulación. En determinadas exposiciones, los dispositivos implantables de administración de fármaco pueden utilizarse para introducir la composición de muteína de IL-2.

Las composiciones farmacéuticas: adicionales resultarán evidentes para el experto en la materia, incluyendo formulaciones que implican composiciones de muteína de IL-2 en formulaciones de administración sostenida o controlada. Las técnicas para formular una diversidad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional nº PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Entre las preparaciones de liberación sostenida pueden incluirse matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p.ej., películas o microcápsulas. Entre las matrices de liberación sostenida pueden incluirse poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (tal como se da a conocer en la patente US nº 3.773.919 y solicitud de patente europea nº de publicación EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 2:547-556, 1983), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981 y Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982), acetato de etilén-vinilo (Langer et al., *supra*, 1981) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (solicitud publicada de patente europea nº EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir además liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos de la técnica. Ver, p.ej., Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692, 1985; solicitudes publicadas de patente europea nº EP 036.676, nº EP 088.046 y nº EP 143.949.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración *in vivo* se proporcionan típicamente como preparaciones estériles. La esterilización puede llevarse a cabo mediante filtración a través de membranas de filtración estéril. En el caso de que se liofilice la composición, la esterilización utilizando dicho método puede llevarse a cabo antes o después de la liofilización y reconstitución. Las composiciones para la administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Las composiciones parenterales generalmente se introducen en

un recipiente que presenta un puerto de acceso estéril, por ejemplo una bolsa o vial de solución intravenosa que presenta un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

5 La exposición de la invención incluye formulaciones de muteína de IL-2 autotamponadas, las cuales pueden utilizarse como composiciones farmacéuticas, tal como se indica en la solicitud de patente internacional nº WO 06138181A2 (nº PCT/US2006/022599).

10 Tal como se ha comentado anteriormente, determinadas exposiciones proporcionan composiciones de muteína de IL-2, particularmente proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc farmacéuticas que comprenden, además de la composición de muteína de IL-2, uno o más excipientes, tales como los indicados ilustrativamente en la presente sección y en otros sitios en la presente memoria. Los excipientes pueden utilizarse en la invención a este respecto para una amplia diversidad de fines, tales como el ajuste de las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tal como el ajuste de la viscosidad, y/o procedimientos de la invención para mejorar la eficacia y/o para 15 estabilizar tales formulaciones y procedimientos contra la degradación y el deterioro debido a, por ejemplo, tensiones que se producen durante la fabricación, transporte, almacenamiento, preparación preutilización, administración y posteriores.

20 Se encuentra disponible una diversidad de exposiciones sobre la estabilización de las proteínas y los materiales y métodos de formulación útiles en este contexto, 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 pertinentes a los excipientes y procedimientos de los mismos para formulaciones de proteína autotamponadas según la presente invención, especialmente respecto a productos y 25 procedimientos farmacéuticos de proteínas para usos veterinarios y/o médicos humanos.

30 Pueden utilizarse sales de acuerdo con determinadas exposiciones de la invención para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición de acuerdo con la invención.

35 Tal como es bien conocido, los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas mediante la unión a residuos cargados sobre la superficie de la proteína y mediante la protección de grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, interacciones atractivas y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína mediante la unión a, en particular, los enlaces peptídicos desnaturalizados (--CONH) de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también pueden reducir interacciones electrostáticas intermoleculares y, de esta manera, evitar o reducir la 40 agregación e insolubilidad de la proteína.

45 Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado varias clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas, que pueden utilizarse en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie de Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y no iónicos polares según su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizadores se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizadores se denominan "caotrópicos". Los cosmotropos comúnmente se utilizan a concentraciones elevadas (p.ej., sulfato amónico >1 molar) para precipitar proteínas de la solución ("salting-out"). Los caótropos se utilizan comúnmente para desnaturalizar y/o 50 solubilizar proteínas ("salting-in"). La efectividad relativa de los iones al "salt-in" y al "salt-out" define su posición en la serie de Hofmeister.

55 Los aminoácidos libres pueden utilizarse en formulaciones de muteína de IL-2 de acuerdo con diversas realizaciones de la invención como agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes, así como otros usos estándares. Puede utilizarse lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina resulta útil en la liofilización para garantizar una estructura y propiedades correctas de la torta. La arginina puede resultar útil para inhibir la agregación de la proteína, en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas. La metionina resulta útil como antioxidante.

60 Entre los polioles se incluyen azúcares, p.ej., manitol, sacarosa y sorbitol, y alcoholes polihídricos, tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, para los fines del comentario en la presente memoria, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizadores útiles en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas frente a los procesos de degradación física y química. Los polioles también resultan útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones.

65 Entre los polioles útiles en exposiciones seleccionadas de la invención se encuentran el manitol, utilizado comúnmente para garantizar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Garantizar la estabilidad estructural de la torta. Generalmente se utiliza con un lioprotector, p.ej., sacarosa. El sorbitol y la sacarosa son de entre los agentes preferentes para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para la protección frente a las tensiones de congelación-descongelación durante el transporte o la preparación de volúmenes durante el procedimiento de

fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libres), tales como glucosa y lactosa, pueden glicar los residuos superficiales de lisina y arginina. Por lo tanto, generalmente no son de los polioles preferentes para la utilización según la invención. Además, los azúcares que forman dichas especies reactivas, tales como sacarosa, que se hidroliza en fructosa y glucosa bajo condiciones ácidas, y en consecuencia produce glicación, tampoco se encuentre entre los polioles preferentes de la invención a este respecto. El PEG resulta útil para estabilizar proteínas y como crioprotector y puede utilizarse en la invención en este aspecto.

Las exposiciones de formulaciones de muteína de IL-2 comprenden además surfactantes. Las moléculas de proteína pueden ser susceptibles de adsorción sobre las superficies y a la desnaturalización y consecuente agregación en interfaces de aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos generalmente son inversamente proporcionales a la concentración de la proteína. Estas interacciones perjudiciales generalmente son inversamente proporcionales a la concentración de proteína y típicamente resultan exacerbadas por la agitación física, tal como la generada durante el transporte y manipulación de un producto.

Los surfactantes se utilizan rutinariamente para evitar, minimizar o reducir la adsorción superficial. Entre los surfactantes útiles en la invención a este respecto se incluyen polisorbato-20, polisorbato-80, otros ésteres de ácido graso de polietoxilatos de sorbitano, y poloxámero-188.

Los surfactantes también se utilizan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. La utilización de surfactantes a este respecto es específica de la proteína ya que cualquier surfactante dado típicamente estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son susceptibles de degradación oxidativa y, con frecuencia, tal como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para causar la oxidación de las cadenas laterales de residuos de la proteína, especialmente de metionina. En consecuencia, los polisorbatos deben utilizarse con cuidado, y en caso de utilizarse, deben utilizarse a su concentración eficaz más baja. A este respecto, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes deben utilizarse en sus concentraciones eficaces mínimas.

Las exposiciones adicionales de formulaciones de muteína de IL-2 comprenden además uno o más antioxidantes. En cierto grado, la oxidación nociva de proteínas puede evitarse en formulaciones farmacéuticas mediante el mantenimiento de niveles apropiados de oxígeno y temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. Pueden utilizarse excipientes antioxidantes, también para evitar la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto se encuentran agentes reductores, oxígeno/secuestrantes de radicales libres y agentes quelantes. Los antioxidantes para la utilización en formulaciones terapéuticas de proteínas según la invención preferentemente son solubles en agua y mantienen su actividad durante toda la vida útil del producto. EDTA es un antioxidante preferente según la invención en este aspecto.

Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, los agentes reductores, tales como el glutatión en particular, pueden romper enlaces disulfuro intramoleculares. De esta manera, se seleccionan antioxidantes para la utilización en la invención, entre otras cosas para eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que ellos mismos dañen proteínas en la formulación.

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

Pueden utilizarse iones de magnesio (10 a 120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico en ácido isoaspártico. Los iones  $\text{Ca}^{+2}$  (hasta 100 mM) pueden incrementar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana.  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ , y  $\text{Zn}^{+2}$ , sin embargo, pueden desestabilizar la ADNasa<sub>rh</sub>. De manera similar,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Sr}^{+2}$  pueden estabilizar el factor VIII; puede desestabilizarse con  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ , y su agregación puede incrementarse con iones  $\text{Al}^{+3}$ .

Las exposiciones de formulaciones de muteína de IL-2 comprenden además uno o más conservantes. Los conservantes resultan necesarios al desarrollar formulaciones parenterales multidosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función primaria es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante la vida útil o condiciones de uso del producto fármaco. Entre los conservantes utilizados comúnmente se incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes presentan una larga historia de uso con parenterales de molécula pequeña, el desarrollo de formulaciones de proteína que incluyan conservantes puede resultar compleja. Los conservantes prácticamente en todos los casos presentan un efecto desestabilizante (agregación) de las proteínas y esto se ha convertido en un factor importante en la limitación de su uso en las formulaciones de proteína multidosis. Hasta hoy, la mayoría de fármacos proteínas se han formulado para el uso individual únicamente. Sin embargo, en el caso de que resulten posibles las formulaciones multidosis, presentan la ventaja añadida de la comodidad para el paciente y una comerciabilidad incrementada. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (HCh), en la que el desarrollo de formulaciones conservadas ha conducido a la comercialización de presentaciones más cómodas de pluma de inyección multiuso. Actualmente se encuentran

disponibles en el mercado por lo menos cuatro de tales dispositivos de pluma que contienen formulaciones conservadas de HCh. La norditropina (líquida, Novo Nordisk), la Nutropin AQ (líquida, Genentech) y la genotropina (liofilizada-cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatropo (Eli Lilly) se formula con m-cresol.

En una exposición, se formula una muteína de IL-2 o fusión de Fc de una muteína de IL-2, tal como, por ejemplo, Fc.IL-2(V91K) o Fc.IL-2(N88D), a una concentración de 10 mg/ml en ácido L-glutámico 10 mM, L-prolina al 3,0% (p/v), a pH 5,2. En otra realización, se formula una muteína de IL-2 o fusión de Fc de una muteína de IL-2, tal como, por ejemplo, Fc.IL-2(V91K) o Fc.IL-2(N88D), en KPi 10 mM, L-arginina 161 mM, a pH 7,6.

Necesitan considerarse varias exposiciones durante la formulación y desarrollo de formas de administración conservadas. La concentración de conservante eficaz en el producto fármaco debe optimizarse. Esto requiere el ensayo de un conservante dado en la forma de administración con intervalos de concentración que proporcionan eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína.

En otra exposición, la presente invención proporciona muteína de IL-2 o fusiones de Fc de muteínas de IL-2 en formulaciones liofilizadas. Los productos secados por congelación pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un conservante que contiene diluyente en el momento de la utilización. Esto acorta el tiempo durante el que el conservante se encuentra en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos asociados de estabilidad. Con las formulaciones líquidas, la eficacia y estabilidad del conservante deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (aproximadamente 18 a 24 meses). Un punto importante que debe indicarse es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

Las formulaciones de muteína de IL-2 generalmente se diseñan para vías y métodos de administración específicos, para dosis de administración y frecuencias de administración específicos, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. De esta manera, las formulaciones pueden diseñarse según la invención para la administración mediante cualquier vía adecuada, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la vía oral, aural, oftálmica, rectal y vaginal, y por vías parenterales, incluyendo la inyección intravenosa e intraarterial, la inyección intramuscular y la inyección subcutánea.

Una vez se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o como unos polvos deshidratados o liofilizados. Tales formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para utilizar o en una forma (p.ej., liofilizada) que se reconstituye antes de la administración. La invención proporciona además kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits de la invención pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que presenta una proteína seca como un segundo recipiente que presenta una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de la presente invención, se proporcionan kits que contienen jeringas prerellenas individuales y multicámara (p.ej., jeringas líquidas y liojeringas).

La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene muteína de IL-2 que debe utilizarse dependerá, por ejemplo, del contexto y objetivos terapéuticos. El experto en la materia apreciará que los niveles apropiados de dosis para el tratamiento dependerán, en parte, de la molécula administrada, de la indicación para la que se utiliza 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 determinadas exposiciones, el médico clínico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 1 mg/kg o más, dependiendo de los factores indicados anteriormente. En realizaciones específicas, la dosis puede encontrarse comprendida entre 0,5 µg/kg y hasta aproximadamente 100 µg/kg, opcionalmente entre 2,5 µg/kg y hasta aproximadamente 50 µg/kg.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de IL-2 preferentemente resulta en una reducción de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, en un incremento de la frecuencia o duración de los periodos libres de síntomas de la enfermedad, o en la prevención del defecto o discapacidad debido a la enfermedad.

Pueden administrarse composiciones farmacéuticas utilizando un dispositivo médico. Se describen ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas en las patentes US nº 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.

#### Tratamiento de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios

En determinadas realizaciones, se utiliza una muteína de IL-2 de la invención para tratar un trastorno autoinmunitario o inflamatorio. En realizaciones preferentes, se utiliza una proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc.

Entre los trastornos que resultan particularmente susceptibles de tratamiento con la muteína de IL-2 dada a conocer en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, inflamación, enfermedad autoinmunitaria,

enfermedades atópicas, enfermedades autoinmunitarias paraneoplásicas, inflamación de cartílagos, 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 SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis juvenil, artritis sorriática juvenil, escleroderma 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 SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis, artritis sorriática, escleroderma, vasculitis, miolitis, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjögren, soriasis, soriasis de placas, soriasis guttata, soriasis inversa, soriasis pustular, soriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple (EM), asma, EPOC, rinosinusitis, rinosinusitis con pólipos, esofagitis eosinofílica, bronquitis eosinofílica, enfermedad de Guillain-Barre, diabetes mellitus de tipo I, tiroiditis (p.ej., enfermedad de Graves), enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, EICH, rechazo del trasplante, daño renal, vasculitis inducida por hepatitis C, pérdida espontánea del feto, y similares.

En otra realización, la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria es lupus, enfermedad del injerto contra el huésped, vasculitis inducida por hepatitis C, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, pérdida espontánea del feto, enfermedades atópicas y enfermedades intestinales inflamatorias.

En otra exposición, se trata un paciente que presenta o está en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario o inflamatorio, con una muteína de IL-2 (por ejemplo, una muteína de IL-2 dada a conocer en la presente memoria, tal como una fusión de muteína de IL-2Fc tal como se da a conocer en la presente memoria, u otra muteína de IL-2 conocida de la técnica o IL-2 de tipo salvaje, opcionalmente como parte de una molécula de fusión de Fc del tipo indicado en la presente memoria) y se monitoriza la respuesta del paciente al tratamiento. La respuesta del paciente que se monitoriza puede ser cualquier respuesta detectable o medible del paciente al tratamiento, o cualquier combinación de tales respuestas. Por ejemplo, la respuesta puede ser un cambio en el estadio fisiológico del paciente, tal como la temperatura corporal o la fiebre, apetito, sudoración, cefalea, náusea, fatiga, hambre, sed, agudeza mental o similar. Alternativamente, la respuesta puede ser un cambio de la cantidad de un tipo celular o producto génico (por ejemplo, una proteína, péptido o ácido nucleico), por ejemplo, en una muestra de sangre periférica extraída del paciente. En una realización, el régimen de tratamiento del paciente se altera en el caso de que el paciente presente una respuesta detectable o medible al tratamiento, o en el caso de que tal respuesta cruce un umbral particular. La alteración puede ser una reducción o incremento de la frecuencia de administración, o una reducción o incremento de la cantidad de la muteína de IL-2 administrada por dosis, o un 'descanso' de la administración (es decir, un cese temporal del tratamiento, durante un periodo de tiempo especificado o hasta que el médico responsable determine si el tratamiento debería continuar, o hasta que una respuesta monitorizada del paciente indique que el tratamiento debería o puede reanudarse), o la terminación del tratamiento. En una exposición, la respuesta es un cambio de la temperatura o niveles de CRP del paciente. Por ejemplo, la respuesta puede ser un incremento de la temperatura corporal del paciente o un incremento de los niveles de CRP en una muestra de sangre periférica, o ambos. En una realización particular, el tratamiento del paciente se reduce, se suspende o se termina en el caso de que la temperatura corporal del paciente se incremente durante el curso del tratamiento mediante por lo menos 0,1°, 0,2°, 0,3°, 0,4°, 0,5°, 0,7°, 1°, 1,5°, 2° o 2,5°C. En otra exposición particular, el tratamiento del paciente se reduce, se suspende o se termina en el caso de que la concentración de CRP en una muestra de la sangre periférica del paciente se incremente durante el curso del tratamiento en por lo menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5 o 2 mg/ml. Otras reacciones del paciente que pueden monitorizarse y utilizarse para decidir si modificar, reducir, suspender o terminar el tratamiento incluyen el desarrollo o agravamiento del síndrome de fuga capilar (hipotensión e inestabilidad cardiovascular), función de neutrófilos deteriorada (por ejemplo, que resulta en, o en donde se detecta, el desarrollo o agravamiento de una infección), trombocitopenia, angiopatía trombótica, reacciones en el sitio de inyección, vasculitis (tal como la vasculitis del virus de la hepatitis C) o síntomas o enfermedades inflamatorias. Entre reacciones adicionales del paciente que pueden monitorizarse y utilizarse para decidir si modificar, reducir, incrementar, suspender o terminar el tratamiento se incluyen un incremento del número de células NK, células Treg, células T CD4 FOXP3<sup>-</sup>, células T CD4 FOXP3<sup>+</sup>, células T CD8 FOXP3<sup>-</sup>, o eosinófilos. Pueden detectarse incrementos de dichos tipos celulares, por ejemplo como un incremento del número de tales células por unidad de sangre periférica (por ejemplo, expresada como un incremento de células por mililitro de sangre) o como un incremento del porcentaje de dicho tipo celular en comparación con otro tipo de células o células en la muestra de sangre. Otra reacción de paciente que puede monitorizarse es un incremento de la cantidad de muteína de IL-2 unida a la superficie celular sobre las células CD25<sup>+</sup> en una muestra de la sangre periférica del paciente.

#### Métodos de expansión de células Treg

La muteína de IL-2 o proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc puede utilizarse para expandir las células Treg dentro de un sujeto o muestra. En la presente memoria se proporcionan métodos para incrementar la proporción de células Treg a células T no reguladoras. El método comprende poner en contacto una población de células T con una cantidad eficaz de una muteína de IL-2 humana o fusión de muteína de IL-2-Fc. La proporción puede medirse mediante la

determinación de la proporción de células CD3<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> a células CD3<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> dentro de la población de células T. La frecuencia de Treg típica en la sangre humana es de 5% a 10% de las células T CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> totales; sin embargo, en las enfermedades listadas anteriormente, dicho porcentaje puede ser más bajo o más alto. En exposiciones preferentes, el porcentaje de Treg se incrementa por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400%, por lo menos 500%, por lo menos 600%, por lo menos 700%, por lo menos 800%, por lo menos 900% o por lo menos 1000%. El factor de incremento máximo de las Treg puede variar para enfermedades particulares; sin embargo, una frecuencia máxima de Treg que podría obtenerse mediante tratamiento con muteína de IL-2 es de 50% o 60% del total de células T CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>. En determinadas exposiciones, la muteína de IL-2 o proteína de fusión de muteína de IL-2-Fc se administra en un sujeto y se incrementa la proporción de células T reguladoras (Treg) a células T no reguladoras en la sangre periférica de un sujeto.

Debido a que las proteínas de muteína de IL-2 y de fusión de muteína de IL-2-Fc preferentemente expanden las Treg respecto a otros tipos celulares, también resultan útiles para incrementar la proporción de células T reguladoras (Treg) a células asesinas naturales (NK) en la sangre periférica de un sujeto. La proporción puede medirse mediante la determinación de la proporción de células CD3<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> a linfocitos CD16<sup>+</sup> y/o CD56<sup>+</sup> que son CD19<sup>-</sup> y CD3<sup>-</sup>.

Se encuentra contemplado que las muteínas de IL-2 o proteínas de fusión de muteína de IL-2-Fc puedan presentar un efecto terapéutico sobre una enfermedad o trastorno en un paciente sin expandir significativamente la proporción de Treg a células T no reguladoras o células NK en la sangre periférica del paciente. El efecto terapéutico puede deberse a la actividad localizada de la muteína de IL-2 o proteína de fusión de IL-2-Fc en el sitio de inflamación o autoinmunidad.

**Ejemplos**

Los ejemplos a continuación, tanto actuales como proféticos, se proporcionan con el fin de ilustrar realizaciones o características específicas de la presente invención y no pretenden limitar su alcance.

Ejemplo 1 - reducción del número de mutaciones que confieren elevada afinidad para CD25

Las muteínas de IL-2 con elevada afinidad para CD25 y reducida fuerza de señalización a través de IL-2Rβγ preferentemente estimulan el crecimiento y función de las Treg. Para reducir la inmunogenicidad potencial, se busca el número mínimo de mutaciones necesario para conseguir una elevada afinidad para CD25. La estructura cristalina de IL-2 en complejo con sus tres receptores (código PDG -2B5I) muestra que V69A y Q74P se encuentran localizados en la estructura helicoidal que interactúa con CD25. Esto podría explicar por qué V69A y Q74P se aislaron frecuentemente en dos cribados independientes de mutagénesis de IL-2 para elevada afinidad de unión a CD25 (Rao et al., 2005; Thanos et al., 2006). El presente ejemplo explora cuál de las otras mutaciones en la muteína de IL-2 "2-4" identificada en el cribado de Rao et al. son las más importantes para incrementar la afinidad a un nivel superior al observado con V69A y Q74P solos. Se cribaron las proteínas siguientes mediante citometría de flujo para la unión a CD25 sobre la superficie de las células T activadas. Todos los constructos también incluían un FLAG C-terminal y etiqueta poli-His para la purificación y detección. Las mutaciones específicas se proporcionan entre paréntesis.

**HaMut1D(V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 8)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKH LQCLEEEELKPLEEALN LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut2D (N30S,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 9)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINSYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKH LQCLEEEELKPLEEALN LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut3D (K35R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 10)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFK FYPMPKKATELKH LQCLEEEELKPLEEALN LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut4D (T37A,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 11)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLARM LTFK FYPMPKKATELKH LQCLEEEELKPLEEALN LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut5D (K48E,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 12)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKATELKH LQCLEEEELKPLEEALN LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut6D (E68D,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 13)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKH LQCLEEEELKPLEDALN LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut7D (N71R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEC ID nº 14)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYPMPKKATELKH LQCLEEEELKPLEEALRL LAPSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

**HaMut8D (K35R,K48E,E68D,N88D,C125A) (SEC ID nº 15)**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFK FYPMPKATELKH LQCLEEEELKPLEDVLNLAQSKN  
FHLRPRDLISDINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSI IISTLT

HaMut7D se unía a CD25 con prácticamente la misma afinidad que el aislado original "2-4" (200 pM), indicando que la mutación N71R era capaz de incrementar en gran medida la afinidad a un nivel superior al observado con V69A, Q74P solos (HaMut1D, 2 nM). Los otros constructos poseían afinidades similares o ligeramente superiores a HaMut1D, con la excepción de HaMut8D, cuya afinidad era sólo ligeramente superior a la de IL-2 WT.

#### Ejemplo 2 - muteínas de IL2- fusionadas con dominios de IgG1-Fc para una semivida mejorada

Para reducir la frecuencia de administración requerida para conseguir un enriquecimiento de Treg con una muteína de IL-2, se evaluaron diversas fusiones entre IL-2 y dominios Fc de IgG1. Los dominios Fc contenían mutaciones puntuales para anular las funciones efectoras mediadas por IgG1, tales como la lisis de la célula diana. Las mutaciones de la función efectora de Fc utilizadas fueron A327Q, Ala Ala (L234A+L235A) o N297G. Debido a que las muteínas de IL-2 selectivas para Treg presentan una reducción parcial de la potencia de IL-2, era importante fusionar IL-2 con Fc de manera que no impactase significativamente sobre la señalización de IL-2R. De esta manera, se sometieron a ensayo las muteínas de IL-2 para la activación de IL-2R con y sin fusión de Fc.

Para determinar si la dimerización de IL-2 mediante fusión de Fc incrementaría la fuerza de señalización de IL-2R debido a la avidéz incrementada para IL-2R, se fusionó una muteína de IL-2 más débil (haD5) (documento nº US2011/0274650) con el extremo amino-terminal de Fc, separado por una secuencia conectora GGGGS (SEC ID nº 5). Esta muteína poseía 3 mutaciones que impactaban sobre la señalización de IL-2R (E15Q, H16N, N88D), 8 mutaciones que conferían una elevada afinidad para CD25 (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) (Rao et al. 2005) y C125S para evitar el apareamiento incorrecto de cisteínas y la agregación. La fusión a Fc de esta manera anuló por completo la actividad biológica de haD5, mientras que se potenció su unión de alta afinidad a CD25 de superficie celular, probablemente debido a la avidéz incrementada por la dimerización.

Las muteínas de IL-2 también se fusionaron con el extremo N-terminal o C-terminal de un heterodímero de Fc, de manera que sólo una cadena del dímero de Fc portaba el dominio de IL-2. El apareamiento heterodimérico entre dos cadenas Fc asimétricas se estimuló mediante interacciones electrostáticas entre las lisinas introducidas en una cadena Fc y ácidos aspárticos introducidos en la otra cadena Fc. Se fusionó la muteína de IL-2 haD6 con el extremo N-terminal de una cadena Fc o la otra, en el caso de que resultase preferente una configuración, resultando en dos constructos de proteínas denominados haD6.FcDD y haD6.FcKK. También se fusionó la muteína haMut7D con el extremo C-terminal del heterodímero de Fc con uno o dos conectores GGGGS (SEC ID nº 5) (FcKK(G4S)haMut7D, FcKK(G4S)<sub>2</sub>haMut7D). La fusión de la muteína de IL-2 haD6 con el extremo N-terminal del heterodímero de Fc resultó en una pérdida parcial de actividad respecto a haD6 libre en experimentos de tanto pSTAT5 como de proliferación de células T. En contraste, la fusión de haMut7D al extremo C-terminal del heterodímero de c con uno o dos conectores GGGGS (SEC ID nº 5) no alteró la potencia de haMut7D.

También se investigó la fusión de una muteína de IL-2 al extremo C-terminal de un homodímero de Fc. Se activaron las PBMC totales en matraces de cultivo de tejidos T75 a razón de 300 millones de células por cada 100 ml con 100 ng/ml de anti-CD3 (OKT3). El día 3 de cultivo, las células se lavaron 3 veces y se dejaron en reposo en medio fresco durante 3 días. A continuación, las células se estimularon con variantes de IL-2 a una titulación de dosis 10x comprendida entre 1 pM y 10 nM a un volumen final de 50 µl. Se midió el nivel de fosforilación STAT5 utilizando el kit de tampón BD phosflow. Brevemente, se añadió 1 ml de tampón BD phosflow de lisis/fijación para detener la estimulación. Las células se fijaron durante 20 min a 37°C y se permeabilizaron con 1x tampón perm BD phosflow sobre hielo antes de la tinción para CD4, CD25, FOXP3 y pSTAT5.

Tal como puede observarse en la fig. 1, la bioactividad de las muteínas haMut1D y haMut7D no se alteró mediante fusión con el extremo C-terminal de un homodímero de Fc. De esta manera, la fusión entre el extremo N-terminal de IL-2 y el extremo C-terminal de Fc no comprometió la actividad agonista de las muteínas de IL-2, ni siquiera en el contexto de un homodímero de Fc.IL-2. En estos constructos, se utilizó la mutación C125A en lugar de C125S para mejorar la producción.

#### Ejemplo 3 -- ajuste de la potencia de la muteína de IL-2 para conseguir un crecimiento preferente de Treg

El panel inicial de muteínas de IL-2 contenía N88D solo o con 1 o 2 mutaciones adicionales con impacto en la señalización de IL-2R. Se diseñó un segundo panel de muteínas, la totalidad con mutaciones puntuales individuales, con el objetivo de identificar las muteínas con un agonismo similar o ligeramente más potente que las de la serie de N88D. Se identificó un panel de 24 mutaciones de señalización basándose en los aminoácidos de interacción con IL-2Rβ predichos (estructura cristalina, código PDB - 2B5I). Se seleccionaron sustituciones particulares basándose en la reducción predicha de la energía libre de unión entre la muteína e IL-2Rβ. Se calculó la energía libre de unión utilizando el algoritmo computacional EGAD (Handel's Laboratory, University of California en San Diego, EE.UU.). La energía libre de unión de mutante se define como  $\Delta\Delta G_{mut} = \mu(\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$ , donde  $\mu$  (=0,1, en general) es el factor de escalado utilizado para normalizar los cambios predichos de afinidad de unión para presentar una pendiente de 1 en la comparación con las energías experimentales (Pokala y Handel 2005). La energía libre de disociación ( $\Delta G$ ) se definió como la diferencia de energías entre el estado de complejo ( $\Delta G_{unido}$ ) y el estado libre ( $\Delta G_{libre}$ ). Se calculó la energía de disociación  $\Delta G_{mut}$  para cada sustitución.

Un panel de muteínas de IL-2 con las sustituciones siguientes (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 C-terminales con el heterodímero de Fc. Estos constructos contenían además las mutaciones de haMut7 para la afinidad de unión elevada a CD25 (V69A, N71R, Q74P) y a C125A para un plegamiento eficiente.

Se cribó el panel para potencial en el ensayo de fosforilación de STAT5 de células T del Ejemplo 2 y se encontró que H16E, D84K, V91N, V91K y V91R poseían una actividad inferior a la de IL-2 de tipo salvaje y superior a la de N88D (Fig. 2).

H16E, D84K, V91N, V91K y V91R poseían una actividad inferior a la de IL-2 de tipo salvaje y superior a la de N88D.

También se sometieron a ensayo muteínas seleccionadas en ensayos de crecimiento de células T y NK.

Para el ensayo de células T, se activaron PBMC totales a razón de 3 millones/ml con 100 ng de OKT3. El día 2, las células se lavaron 3 veces y se dejaron en reposo en medio fresco durante 5 días. A continuación, las células se marcaron con CFSE y se cultivaron adicionalmente en una placa de 24 pocillos a razón de 0,5 millones/pocillo en medio que contenía IL-2 durante 7 días antes del análisis de FACS. La proliferación de subgrupos de células T se presenta en la fig. 3 como dilución de CFSE (mediana de fluorescencia de CFSE).

Para el ensayo de células NK, se cultivaron células NK CD16<sup>+</sup> separadas mediante MACS, en medio que contenía IL-2 durante 3 días a razón de 0,1 millones/pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron 0,5 µCi de <sup>3</sup>H-timidina a cada pocillo durante las 18 horas finales de incubación. Se muestran los resultados en la fig. 4.

Los mutantes H16E, D84K, V91N, V91K y V91R eran capaces de estimular un crecimiento de las Treg similar al de IL-2 WT, pero eran aproximadamente 10x menos potentes sobre las otras células T (fig. 3) y aproximadamente 100x menos potentes sobre las células NK (fig. 4).

Se diseñó un panel separado 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 truncados de aminoácidos individuales.

Fc.haMut7 Fc...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7  
(SEC ID nº 22)

Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 23)

Trunc2 Fc...TQKSLSL-STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 24)

Trunc3 Fc...TQKSLSL--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 25)

Trunc4 Fc...TQKSLSL---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 26)

Trunc5 Fc...TQKSLSL----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 27)

Trunc6 Fc...TQKSLSL-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 28)

Trunc7 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 29)

Trunc8 Fc...TQKSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEC ID nº 30)

Trunc1-Trunc4 poseían una potencia igual al constructo parental de longitud completa Fc.haMut7 según se mide mediante la fosforilación de STAT5 y mediante la proliferación de las células T y NK tal como se indica en las figs. 2, 3 y 4. Trunc5 y Trunc6 estimularon respuestas más débiles, aunque 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 presentó muy poca actividad. Sin embargo, al someterla a ensayo sobre células NK, Trunc5 y Trunc6 eran agonistas más fuertes que V91K, indicando que la selectividad de Treg se alcanzaba más fácilmente con mutaciones de señalización que el impedimento estérico por un dominio Fc proximal.

Ejemplo 4 - mutaciones de elevada afinidad de CD25 en el contexto de un homodímero de Fc

Las mutaciones que conferían elevada afinidad de unión a CD25 se consideraron ventajosas porque incrementaron el tropismo para las células T con nivel elevado de CD25 y debido a que estimularon una asociación a largo plazo de

CD25::múteína de IL-2 y una señalización prolongada. Sin embargo, la reducción del número de mutaciones puede reducir el potencial de inmunogenicidad. Las múteínas N88D o V91K, con y sin las mutaciones de afinidad elevada haMut1 V69A y Q74P se expresaron como fusiones con el extremo C-terminal de un homodímero de Fc y se compararon para la bioactividad. En los ensayos de estimulación de pSTAT5, la homodimerización no presentó ningún efecto sobre la fuerza de la señal respecto a la múteína monomérica. La reversión de las mutaciones de afinidad elevada V69A y Q74P tampoco afectó a la señalización de pSTAT5. En los ensayos de crecimiento de células T, las mutaciones de afinidad elevada redujeron la actividad sobre las células T CD4 y células T CD8 convencionales pero no sobre las células T reguladoras (fig. 5). Las mutaciones de afinidad elevada tampoco alteraron las respuestas proliferativas de las células NK (fig. 6).

Para determinar si las mutaciones de afinidad elevada impactaban sobre las respuestas de células T *in vivo*, se administraron en ratones humanizados (ratones NOD.SCID.IL2rg-null reconstituidos con células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> humanas) con las proteínas de fusión de Fc.múteína de IL-2 y se monitorizó la expansión de Treg. Se irradiaron ratones NOD.SCID.IL2rg-null (NSG) de siete semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) (180 rad) y se reconstituyeron con 94.000 células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> hepáticas fetales humanas. A las 21 semanas, los ratones se distribuyeron en 6 grupos basándose en una distribución igual del porcentaje de quimerismo (determinado mediante citometría de flujo de leucocitos de sangre periférica (LSP)) y recibieron 1 µg de inyecciones subcutáneas de las proteínas de fusión de Fc.múteína indicadas o PBS el día 0 y el día 7. El día 11, se determinaron las frecuencias de los subgrupos de células T en sangre mediante citometría de flujo. A la dosis baja de 1 µg por animal, las mutaciones de afinidad elevada no mejoraron la expansión de Treg más allá de lo observado con las mutaciones N88D o V91K solas (fig. 7).

La expansión de Treg era selectiva en el aspecto de que las células T FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> no se incrementaron en abundancia respecto a los leucocitos de sangre periférica (LSP), que incluían una mezcla de células B y T humanas, y células mieloides de ratón. Además, a dosis más elevadas, las mutaciones de afinidad elevada estimularon un incremento de las células T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, reduciendo de esta manera la selectividad de las Treg. De esta manera, en el contexto del homodímero de Fc, las mutaciones de afinidad elevada no se consideraron necesarias para estimular el crecimiento preferente de las Treg.

**Fc.WT IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(C125A) (SEC ID nº 16)**

DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

**GGGGS**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI  
SNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

**Fc.haMut1V91K IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEC ID nº 17)**

DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

**GGGGS**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQCLEEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI  
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

**Fc.V91K (o Fc.IL-2(V91K)) IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A) (SEC ID nº 18)**

DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

**GGGGS**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI  
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

**Fc.haMut1N88D IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEC ID nº 19)**

DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

**GGGGS**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQCLEEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI  
SDINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

**Fc.N88D (o Fc.IL-2(N88D)) IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(N88D, C125A) (SEC ID nº 20)**

DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

**GGGGS**

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKPKLTRMLTFK FYPMPK KATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI  
SDINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Ejemplo 5 -- asociación prolongada de CD25 de superficie celular de Fc.muteínas de IL-2

Un resultado inesperado de los estudios con ratones humanizados era que, a pesar de su reducida capacidad de señalización, las muteínas indujeron un enriquecimiento de Treg más robusto respecto a Fc.IL-2 WT. Se observó un mayor enriquecimiento en Treg y regulación positiva de FOXP3 respecto a la observada con Fc.WT a una dosis de 1 µg/ratón (figura 7) y a una dosis inferior de 0,5 µg/ratón (fig. 8). Esta potencia incrementada *in vivo* podría haber resultado del consumo reducido por las células T, provocando que más Fc.muteína de IL-2 se encontrara disponible para la señalización prolongada.

Sin embargo, los estudios farmacocinéticos (FC) *in vitro* e *in vivo* no han conseguido demostrar una persistencia significativamente incrementada de Fc.V91K o Fc.N88D respecto a Fc.WT en sobrenadantes procedentes de cultivos de células T activadas o suero procedente de ratones con dosis. Debido a que las fusiones de Fc portaban dos dominios de muteína de IL-2, el reciclado endosómico incrementado podría resultar en una asociación prolongada en la superficie celular debido a la avidéz incrementada para CD25. En efecto, se encontró que Fc.V91K y Fc.N88D persistían más eficientemente que Fc.WT sobre la superficie de células T previamente activadas tras una exposición breve de las proteínas de fusión (fig. 9A y B).

Se preestimularon PBMC primarias durante dos días con 100 ng/ml de OKT3.] Se recolectaron las células, se lavaron cuatro veces y se dejaron en reposo durante la noche en medio. A continuación, las células se pulsaron con Fc.IL-2 400 pM durante 30 min a 37°C. Tras el pulso, se recolectaron las células durante T0 tras un lavado, o se lavaron tres veces adicionales en 12 ml de medio caliente y se cultivaron durante cuatro horas. Para detectar Fc.IL-2 asociado a células, las células se tiñeron con anticuerpo anti-IgG humana-FITC (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pa) y anti-CD25-APC (fig. 9A).

La persistencia de la señalización de IL-2R con Fc.V91K y Fc.N88D respecto a Fc.WT se observó mediante inmunodetección intracelular de fosfo-STAT5 en los mismos puntos temporales. Se muestra la IMF de fosfo-STAT5 para las células T FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (fig. 9B).

Ejemplo 6 -- optimización de las secuencias de fusión

En estudios preclínicos en ratones, las Fc.muteínas de IL-2 mostraron una exposición diferencial al comparar las concentraciones séricas de la molécula intacta con la parte Fc humana únicamente, lo que es indicativo de catabolito Fc humano circulante. Para optimizar la estabilidad y farmacocinética *in vivo* de las Fc.muteínas de IL-2, se caracterizaron modificaciones de la secuencia de fusión para su impacto sobre la degradación proteolítica de las Fc.muteínas de IL-2 en la circulación sistémica y durante el reciclado por el sistema reticuloendotelial. Se evaluaron los constructos siguientes para la degradación proteolítica *in vitro* e *in vivo*.

(Ala_Ala)_G4S	...TQKSLSLSPGKGGGGSA	APTSSSTKKTQLQ...	ha7N88D	(SEC ID nº 31)
(N297G_delK)_G4S	...TQKSLSLSPG	GGGGSA	APTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEC ID nº 32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TQKSLSLSPGA	_____	APTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEC ID nº 33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TQKSLSLSPGA	_____	APASSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEC ID nº 34)

Se midió la estabilidad mediante inmunoensayos cuantitativos comparando concentraciones durante el tiempo de Fc humana total con la de Fc.muteína de IL-2 intacta. Se verificó la proteólisis de las Fc.muteínas de IL-2 mediante análisis de transferencia western utilizando anticuerpos anti-IL-2 y anti-Fc humana, seguido de la inmunocaptura de catabolitos y la caracterización mediante espectrometría de masas. La caracterización mediante espectrometría de masas de los catabolitos de (Ala\_Ala)\_G4S de muestras *in vitro* e *in vivo* identificó la Lys C-terminal del dominio Fc como sitio de corte proteolítico. La delección o mutación de la lisina C-terminal del dominio Fc ((N297G\_delK)\_G4S y (N297G\_KtoA)\_AAPT) resultó en una estabilidad *in vitro* prolongada en suero de ratón a 37°C en comparación con constructos de Fc con la lisina C-terminal ((Ala\_Ala)\_G4S). Esta estabilidad prolongada en suero *in vitro* se tradujo en una mayor exposición de los ratones según se mide por la superficie bajo la curva de concentración sérica de Fc.muteína de IL-2 frente al tiempo (AUC, por sus siglas en inglés). Esta prolongada estabilidad de las Fc.muteínas de IL-2 sin la lisina de Fc C-terminal también se observó *in vitro* en suero de monos *Cynomolgus* y seres humanos. La mutación de Thr-3 de IL-2 a Ala (N297g\_KtoA)\_AAPA resultó en una estabilidad *in vitro* reducida a 37°C (en comparación con (N297G\_KtoA)\_AAPT) en suero de ratón y en incubaciones separadas con catepsina D y L humana recombinante. Esta estabilidad sérica *in vitro* reducida se tradujo en una menor exposición (AUC) de los ratones *in vivo* para (N297G\_KtoA)\_AAPA en comparación con (N297G\_KtoA)\_AAPT. La caracterización de los 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 muteína de IL-2 como residuos susceptibles de proteólisis que no se observó para muestras equivalentes de (N297G\_KtoA)\_AAPT. También se observó una estabilidad reducida a 37°C de (N297G\_KtoA)\_AAPA respecto a la de (N297G\_KtoA)\_AAPT *in vitro* en suero de monos *Cynomolgus* y seres humanos.

Debido a la importancia de la glucosilación en esta región, y para mejorar potencialmente la fabricabilidad de la

proteína de fusión, se alteraron las secuencias de fusión para estimular la glucosilación N-ligada con preferencia a la O-ligada, del modo siguiente.

#### Original

IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A) TOKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (SEC  
ID n° 32)

#### Alteradas

IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A) TOKSLSLSPGGGGGSAPN<sup>1</sup>SSSTKKTQLQ (SEC  
ID n° 35)

IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A) TOKSLSLSPGGGGGSAPN<sup>1</sup>ST<sup>2</sup>STKKTQLQ (SEC  
ID n° 36)

IgG1Fc(N297G\_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TOKSLSLSPGGGGNGTAP<sup>1</sup>SSSTKKTQLQ n (SEC  
ID n° 37)

IgG1Fc(N297G\_delK)::YGGNT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TOKSLSLSPGYGNGTAP<sup>1</sup>SSSTKKTQLQ (SEC  
ID n° 38)

5

#### Ejemplo 7 - Determinación de FC/FD en mono Cynomolgus

Las terapias inmunoestimuladoras de IL-2 estándares requieren el descanso farmacológico (no exposición) entre ciclos de administración para evitar efectos secundarios no deseables. En contraste, las terapias de expansión o estimulación de Treg pueden requerir una exposición prolongada con niveles de fármaco bajos sostenidos ( $C_{min}$  sérica) suficientes para la estimulación de Treg pero con exposiciones máximas ( $C_{max}$  sérica) inferiores a los niveles de fármaco que conducen a la activación inmunológica. El presente ejemplo demuestra las estrategias de administración de muteínas de semivida prolongada en monos Cynomolgus para una cobertura prolongada de la diana ( $C_{min}$  sérico), manteniendo simultáneamente exposiciones máximas ( $C_{max}$  sérica) inferiores a los niveles de fármaco que se contempla que resultan necesarios para la activación inmunológica proinflamatoria.

En monos Cynomolgus se administró Fc.V91K (IgG1Fc(N297G\_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A) en cuatro grupos (A-D), en donde tres grupos (A-C) recibieron dosis subcutáneas y un grupo (D), una dosis intravenosa. Para cada grupo, cuatro monos Cynomolgus macho biológicamente no expuestos recibieron las dosis según la estrategia de administración descrita de manera general posteriormente. La administración subcutánea de muteínas de semivida prolongada podría permitir una mayor absorción linfática, resultando en una exposición máxima más baja ( $C_{max}$  sérico) y/o una respuesta farmacológica más robusta (expansión de Treg). La estrategia de administración para el grupo A consistía en tres dosis consecutivas de 10 microgramos por kilogramo los días 0, 2 y 4 para el ciclo 1 y 10 microgramos por kilogramo el día 14, permitiendo una cobertura prolongada de la diana similar a una dosis inicial más elevada de 50 microgramos por kilogramo, manteniendo simultáneamente una exposición máxima más baja ( $C_{max}$ ). La estrategia de administración para el grupo B es de 50 microgramos por kilogramo administrados los días 0 y 14 para la comparación con el grupo A. La estrategia de administración para el grupo C era de 50 microgramos por kilogramo administrados los días 0 y 28. Determinación de si resulta necesaria la cobertura de depresiones para mantener el enriquecimiento de Treg o si un descanso sin fármaco resulta beneficioso entre ciclos de administración. La estrategia de administración para el grupo D de brazo de administración intravenosa era de 50 microgramos por kilogramo administrados el día 0, permitiendo una comparación de las exposiciones máximas ( $C_{max}$ ) y las diferencias de enriquecimiento de Treg respecto a la administración subcutánea.

Se midió la farmacocinética (inmunoensayo cuantitativo para la molécula intacta y Fc humana total), anticuerpos antifármaco, CD25 soluble liberada y citoquinas séricas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-13) en los puntos temporales siguientes para cada grupo de dosis especificado:

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

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

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

Grupo D: pre-dosis (primer ciclo), 0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 y 672 horas.

Se midió la farmacodinámica (inmunofenotipado y enumeración de Treg de sangre periférica, células T CD4 y CD8 no reguladoras y células NK) en los puntos temporales siguientes para cada grupo de dosis especificado:

- 5 Grupo A: pre-dosis (primer ciclo: dosis 1), 96 (pre-dosis primer ciclo: dosis 3), 168, 336 (pre-dosis segundo ciclo), 456 y 576 horas.  
Grupo B: pre-dosis (primer ciclo), 120, 240, 336 (pre-dosis segundo ciclo), 456 y 576 horas.  
Grupo C: pre-dosis (primer ciclo), 120, 240, 672 (pre-dosis segundo ciclo), 792 y 912 horas.  
Grupo D: pre-dosis (primer ciclo), 120 y 240 horas.

10 Se evaluó la química hematológica y clínica para todos los animales y grupos de dosis pre-dosis y a las 24 horas de la dosis inicial en cada grupo de dosis. Se evaluaron los parámetros siguientes.

Hematología:

- 15 • Recuento de leucocitos (total y diferencial absoluto)  
 • Recuento de eritrocitos  
 • Hemoglobina  
 • Hematócrito  
 20 • Hemoglobina corpuscular media, volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media (calculada)  
 • Reticulocitos absolutos  
 • Recuento de plaquetas  
 • Morfología de las células sanguíneas  
 • Anchura de la distribución de glóbulos rojos  
 25 • Volumen medio de plaquetas

Química clínica:

- 30 • Fosfatasa alcalina  
 • Bilirrubina total (con bilirrubina directa si la bilirrubina total excede de 1 mg/dl)  
 • Aspartato aminotransferasa  
 • Alanina aminotransferasa  
 • gamma-glutamil transferasa  
 • Nitrógeno de urea  
 35 • creatinina  
 • Proteínas totales  
 • albúmina  
 • Globulina y proporción A/G (albúmina/globulina) (calculada)  
 • Glucosa  
 40 • Colesterol total  
 • triglicéridos  
 • Electrolitos (sodio, potasio, cloro)  
 • calcio  
 • fósforo  
 45

Ejemplo 8 - Fc de IgG1 aglucosilada

Los anticuerpos IgG naturales poseen un sitio de glucosilación en el dominio constante 2 de la cadena pesada (CH2). Por ejemplo, los anticuerpos IgG1 humanos presentan un sitio de glucosilación situado en la posición Asn297 (numeración EU). Hasta hoy, las estrategias para producir anticuerpos aglucosilados implican sustituir el residuo Asn por un aminoácido que es similar a Asn en términos de propiedades físicoquímicas (p.ej., Gln) o con un residuo de Ala que imita la cadena lateral de Asn sin los grupos polares. El presente ejemplo demuestra los beneficios de sustituir Asn por glicina (N297G). Fc N297G son moléculas aglucosiladas con mejores propiedades biofísicas y atributos de fabricabilidad (p.ej., recuperación durante la purificación).

55 El examen de múltiples estructuras cristalinas conocidas de fragmentos Fc y anticuerpos IgG reveló una flexibilidad conformacional considerable en torno al segmento de bucle glucosilado, en particular en la posición Asn297 que está glucosilada. En muchas de las estructuras cristalinas conocidas, Asn297 adaptó ángulos diédricos de esqueleto positivo. Gly presenta una elevada tendencia a adaptar el ángulo diédrico de esqueleto positivo debido a la falta de átomos de cadena lateral. Por lo tanto, basándose en este motivo conformacional y estructural, Gly podría ser una mejor sustitución de Asn que N297Q o N297A.  
 60

La mutación de Asn297 por Gly conduce a moléculas aglucosiladas con una recuperación (o eficiencia) muy mejorada en el procedimiento de purificación y las propiedades biofísicas. Por ejemplo, el porcentaje de recuperación (rendimiento final) a partir del pool de la proteína A era de 82,6% para la mutación N297G, en comparación con 45,6% para N297Q y 39,6% para N297A. El análisis de columna SPHP reveló que el porcentaje más bajo de recuperación para los mutantes N297Q y N297A se debía a un pico asimétrico, lo que indica una agregación de peso molecular elevado y/o especies mal plegadas. Este resultado se reconfirmó en una tanda a mayor escala, a escala 2L.

En la industria biofarmacéutica, las moléculas con necesidad potencial de producción a gran escala, p.ej., potencial de comercialización como fármaco, se evaluaron para varios atributos a fin de reducir el riesgo de que la molécula no fuese susceptible de producción y purificación a gran escala. En las evaluaciones de fabricabilidad, N297G reveló robustez frente a los cambios de pH. N297G no presentó ningún problema de agregación, mientras que N297Q y N297A mostraron un incremento de 20% y 10% de la agregación, respectivamente. Aunque N297G presentó mejores atributos de fabricabilidad, era similar a N297Q y N297A en todos los ensayos funcionales en los que se sometió a ensayo. Por ejemplo, en ensayos de ADCC, N297G no presentaba citotoxicidad, de manera similar a N297Q y N297A.

#### Ejemplo 9 - Fc de IgG1 aglucosilado estabilizado

El presente ejemplo describe un método para mejorar la estabilidad de los andamiajes de anticuerpo IgG mediante la introducción de uno o más enlaces disulfuro manipulados. Los anticuerpos IgG naturales son moléculas estables. Sin embargo, para algunas aplicaciones terapéuticas, puede resultar necesario producir mutaciones o crear moléculas aglucosiladas. Por ejemplo, pueden utilizarse moléculas IgG aglucosiladas en indicaciones terapéuticas en las que existe una necesidad de evitar la ADCC y la unión a receptores Fc-gamma. Sin embargo, la IgG1 aglucosilada presenta una temperatura de fusión mucho más baja (la temperatura de fusión del dominio CH2 se reduce en aproximadamente 10°C, de 70°C a 60°C) que la IgG1 glucosilada. La temperatura de fusión más baja observada impacta negativamente sobre diversas propiedades biofísicas de la IgG1 aglucosilada. Por ejemplo, la IgG1 aglucosilada presenta un nivel incrementada de agregación a pH bajo que la IgG1 glucosilada.

Con el fin de manipular los enlaces disulfuro, se utilizó inicialmente un método basado en la estructura que implica el cálculo de la distancia entre los átomos C-alfa, a fin de identificar 54 pares de residuos en la región Fc para la mutación en Cys. Estos 54 sitios se estrecharon adicionalmente a 4 pares de residuos (V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C y V323C-I332C). Los criterios utilizados incluían (i) posiciones dentro del dominio CH2, (ii) lejos de bucles, giros y carbohidratos, (iii) lejos del receptor de Fc-gamma y sitios de interacción de FcRn, (iv) accesibilidad a solvente (posiciones enterradas preferentes), etc.

Las sustituciones de cisteína emparejadas se crearon en el contexto de la Fc N297G aglucosilado. El análisis de mapeado de péptidos no reducidos reveló que tres de los cuatro sitios manipulados formaron enlace disulfuro tal como se esperaba y se había diseñado en ese contexto. La mutación V259C-L306C no formó enlaces disulfuro correctamente y condujo a un emparejamiento incorrecto con el disulfuro nativo ya presente en el dominio CH2. Tres otros diseños, R292C-V302C, A287C-L306C y V323C-I332C, formaron enlace disulfuro correctamente tal como se predecía y diseñaba. La adición del enlace disulfuro a la mutación N297G condujo a una mejora de aproximadamente 15° de estabilidad térmica sobre la mutación N297G sola. De las variantes de disulfuro R292C-V302C, A287C-L306C y V323C-I332C, R292C-V302C y A287C-L306C presentaban una buena farmacocinética al administrarlas en ratas ( $t_{1/2}$  de once días y nueve días, respectivamente). Lo anterior contrasta con el perfil farmacocinética observado en ratas para el enlace disulfuro de dominio CH2 anteriormente publicado (Gong et al., J. Biol. Chem. 284: 14203-14210, 2009), que presentaba un  $t_{1/2}$  de cinco días.

La manipulación de un enlace disulfuro en el dominio CH2 mejora la estabilidad de la molécula aglucosilada de manera equivalente a las moléculas de IgG1 glucosiladas (mejora de 10° a 15° de la temperatura de fusión según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido). Los sitios manipulados indicados en la presente memoria no condujeron al intercambio de disulfuros y se formaron los disulfuros según las predicciones en aproximadamente el 100% de la población. Más importante, al contrario que el sitio de enlace disulfuro publicado en el dominio CH2, los enlaces disulfuros indicados en la presente memoria no impactan sobre la FC de rata.

#### Ejemplo 10

Se compararon *in vitro* los efectos de las mutaciones V91K y N88D sobre las respuestas en células T y NK de monos Cynomolgus y seres humanos. En presencia de CD25 (células T seleccionadas CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en respuestas de pSTAT5 de sangre completa), el efecto de la mutación V91K sobre la señalización de IL-2R de Cynomolgus era despreciable en comparación con su actividad reducida sobre la IL-2R humana. Sin embargo, en ausencia de CD25 (tanto respuestas de pSTAT5 en células T seleccionadas CD25<sup>-</sup> en sangre completa como la proliferación de células NK), la mutación V91K redujo la señalización de IL-2R de Cynomolgus más sustancialmente. En contraste, Fc.N88D mostró una señalización reducida en células T CD25<sup>+</sup> en sangre completa de Cynomolgus que resultaba más similar al efecto de señalización de Fc.V91K en células T en sangre completa humana. Los datos *in vitro* resumidos en la Tabla 2 sugieren que la ventana terapéutica observada con el agonista más débil, Fc.N88D, en monos Cynomolgus, será predictivo de los efectos de Fc.V91K en sujetos humanos.

5 Tabla 2. Resumen de efectos de las mutaciones V91K o N88D sobre las respuestas *in vitro* de células humanas y Cyno

	pSTAT5 de sangre completa		Proliferación de células NK
	Células T CD25 <sup>+</sup>	Células T CD25 <sup>-</sup>	
V91K en cyno	∅	↓	↓
V91K en ser humano	↓	↓↓	↓↓
N88D en cyno	↓	↓↓	↓↓
N88D en ser humano	↓↓	↓↓	↓↓↓

10 Ejemplo - 11

Se llevaron a cabo dos estudios *in vivo* en monos Cynomolgus. El primer estudio con monos Cynomolgus se diseñó para comparar los intervalos de administración de dos semanas y de cuatro semanas de Fc.V91K para determinar si una depresión farmacocinética (FC) y farmacodinámica (FC) completa o parcial alteraba la magnitud de la respuesta a una segunda dosis (figs. 10A y B). Se utilizó una primera dosis, que se predecía que proporcionaba una fuerte respuesta de Treg (50 µg/kg) y una segunda dosis, para explorar los límites inferiores de la ventana terapéutica (10 µg/kg). Debido a que no se conocía si 10 µg/kg era excesivamente baja, se administraron dosis los días 1, 3 y 5 para incrementar la probabilidad de una respuesta. El régimen de administración proporcionó la misma exposición tras el día 5 que la alcanzada con una única dosis subcutánea (SC) de 50 µg/kg, pero con una C-max más baja. También se incluyó un grupo de 50 µg/kg intravenosos (IV) para investigar las potenciales diferencias de FD según la mayor exposición a fármaco en compartimientos linfático frente a sanguíneo. Los resultados de este estudio establecieron que cada uno de los niveles de dosis indujo una fuerte respuesta de crecimiento de Treg sin sucesos adversos (SA) o Tef o crecimiento de NK, y que las respuestas a una segunda dosis el día 14 o el día 28 eran equivalentes.

25 Tabla 3. Diseño de estudio para primer estudio de mono Cynomolgus

Grupo	Nº de animales	Dosificación (días)	Dosis Fc.V91K
1	4	1, 3, 5, 15	10 µg/kg SC
2	4	1, 15	50 µg/kg SC
3	4	1, 29	50 µg/kg SC
4	4	1	50 µg/kg IV

Se diseñó el segundo estudio de monos Cynomolgus para explorar los límites de la ventana terapéutica con dosis de Fc.V91K de 1, 3, 100, 200 µg/kg (SC) y compararlos con el agonista más débil Fc.N88D a las dosis de 3, 10, 100 y 200 µg/kg (SC) y PROLEUKIN® a las dosis de 3, 10, 30 y 100 µg/kg (SC, QDx5). Las dosis de PROLEUKIN® se seleccionaron basándose en estudios publicados con seres humanos y primates no humanos (Hartemann et al., Lancet Diabetes Endocrin 1:295-305, 2013; Saadoun et al., NEJM 365:2067-77, 2011; Aoyama et al., Am. J. Transplantation 12:2532-37, 2012) y se administraron QDx5 para imitar las pruebas clínicas con dosis baja de IL-2 en la vasculitis de VHC y la diabetes de tipo 1 (DT1).

35 Tabla 4. Diseño de estudio para el segundo estudio en mono Cynomolgus

Grupo	Nº de animales	Artículo de ensayo	1º ciclo de tratamiento Día de tratamiento: Dosis (SC)	2º ciclo de tratamiento Día de tratamiento: Dosis (SC)
1	4	PROLEUKIN®	Días 1-5: 3 µg/kg	Días 14-18: 30 µg/kg
2	4	PROLEUKIN®	Días 1-5: 10 µg/kg	Días 14-18: 100 µg/kg
3	4	Fc.V91K	Día 1: 1 µg/kg	Día 14: 100 µg/kg
4	4	Fc.V91K	Día 1: 3 µg/kg	Día 14: 200 µg/kg
5	4	Fc.N88D	Día 1: 3 µg/kg	Día 14: 100 µg/kg
6	4	Fc.N88D	Día 1: 10 µg/kg	Día 14: 200 µg/kg

En las figuras 11A-F, se muestra la cinética de las respuestas celulares, temperatura corporal y CRP sérico. La línea temporal en el eje x se inicia el día 0 y no el día 1 como el día de la primera dosis.

En combinación, los dos estudios con monos Cynomolgus demostraron que las muteínas de IL-2 indujeron un mayor enriquecimiento de Treg con una ventana terapéutica más amplia que la conseguida con PROLEUKIN® (fig. 12A y B). Con PROLEUKIN®, el enriquecimiento de Treg fue equivalente del crecimiento de NK y eosinófilos. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el crecimiento de eosinófilos es una respuesta bien conocida a la terapia de IL-2 y es probablemente el resultado de IL-5 inducido por IL-2 de células linfoides innatas CD25<sup>+</sup>. El crecimiento de Tef de CD4 y CD8 se produjo a dosis que incrementaron las Treg a 25-35% de las células T CD4. En contraste, Fc.V91K y Fc.N88D

indujeron el crecimiento de las Treg con mayor selectividad frente a las células NK y los eosinófilos, y las dosis que estimulaban el crecimiento de Tef eran superiores a las que enriquecían Treg a >40% de las células T CD4.

5 En pruebas clínicas de dosis bajas de IL-2 informadas en la literatura, los primeros SA produjeron fueron síntomas de tipo gripe y fiebre. De esta manera, además de comparar las ventanas terapéuticas, un objetivo del presente estudio fue encontrar un biomarcador que precediese a la fiebre. Tal como se muestra en la fig. 12C, con las dos dosis más elevadas de PROLEUKIN®, se encontró que los niveles de CRP eran paralelos a la temperatura corporal. Con Fc.V91K, se detectó una elevación moderada de la temperatura corporal a la dosis más alta, y en la siguiente dosis más baja, se observó un pequeño incremento de CRP. De esta manera, puede utilizarse CRP para monitorizar la  
10 respuesta de un sujeto al tratamiento con una molécula de la presente invención y/o para definir el límite superior de escalado de dosis en un paciente.

También se observaron determinadas toxicidades en los animales tratados con PROLEUKIN® que eran menos pronunciadas o no se encontraban presentes en los animales tratados con Fc.V91K o con Fc.N88D (fig. 12D, 2002). Se encontró que los niveles de plaquetas, neutrófilos y albúmina eran reducidos por el tratamiento con PROLEUKIN®, mientras que las dosis de Fc.V91K o de Fc.N88D, que resultaban en un enriquecimiento de Treg similar o superior, produjeron poca o ninguna reducción de estos parámetros. Conjuntamente, estos datos indican que la ventana terapéutica para el tratamiento de pacientes con Fc.V91K o Fc.N88D se espera que se significativamente mayor que con PROLEUKIN®.  
15  
20

Ejemplo - 12

En los puntos temporales seleccionados, se sometieron a ensayo sueros del primer estudio de Cynomolgus del Ejemplo 1 para anticuerpos antifármaco (AAF) (fig. 13). Se muestran los datos de señal/ruido de AAF en los que se confirma la especificidad de Fc.V91K. Se sometieron a ensayo los puntos temporales en los que se sometía a ensayo los AAF con líneas verticales sobre el eje x. En el grupo 1, un animal generó AAF por lo menos quince días después de la última dosis; en el grupo 2, ningún animal proporcionó un resultado positivo para AAF, y en el grupo 3, apareció consistentemente AAF en tres animales quince o más días después de la primera dosis. Tras la administración repetida de los grupos 1 y 2 con 50 µg/kg el día 162, ninguno de los animales adicionales proporcionó un resultado positivo para AAF cuatro semanas después (día 190). Los dos animales en el grupo 3 que generaron las señales de AAF más fuertes (210, 212) mostraron una respuesta FD reducida, consistentemente con una Cmax reducida después de la segunda dosis en estos animales. Ningún animal en el cuarto grupo (50 µg/kg IV) proporcionó un resultado positivo para los AAF. La AAF era específica para tanto IL-2 como los dominios Fc, lo que podría esperarse debido a las diferencias de ocho aminoácidos entre IL-2 de Cynomolgus y IL-2(V91K\_C125A) humana. La actividad de neutralización de los AAF no se sometió a ensayo.  
25  
30  
35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

<120> MUTEÍNAS DE INTERLEUQUINA-2 PARA LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS

40 <130> A-1826-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 61/784,669

<151> 2013-03-14

45 <160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 737 598 T3

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (125)..(125)  
 <223> Cys, Ser, Val o Ala

5 <400> 1  
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30  
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45  
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60  
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn 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

10 <210> 2  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (125)..(125)  
 <223> Cys, Ser, Val o Ala

ES 2 737 598 T3

<400> 2

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

<210> 3

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
1 5 10 15

ES 2 737 598 T3

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

5 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 737 598 T3

<400> 4

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

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 737 598 T3

<400> 5  
Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

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

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

10 <400> 6  
Gly Gly Asn Gly Thr  
1 5

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

15 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 7  
Tyr Gly Asn Gly Thr  
1 5

20 <210> 8  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

25 <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

ES 2 737 598 T3

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> 9  
<211> 133  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 9  
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  
10

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

ES 2 737 598 T3

<210> 10  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 10  
 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

10 <210> 11  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 737 598 T3

<400> 11

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

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 12

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

10

ES 2 737 598 T3

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>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 13  
Ala Pro Thr 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

10 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

15 <210> 14  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 737 598 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 14

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

5 <210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de 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

ES 2 737 598 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

<210> 16

<211> 364

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de 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

10

ES 2 737 598 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

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

5 <211> 364

ES 2 737 598 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

5 <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 2 737 598 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  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 18  
 10 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

ES 2 737 598 T3

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 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

ES 2 737 598 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

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de 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

ES 2 737 598 T3

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 Ala Leu Asn Leu Ala  
 290 295 300

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

Asn Val 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> 20  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 737 598 T3

<400> 20

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

ES 2 737 598 T3

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 Asp Ile  
 305 310 315 320

Asn Val 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> 21  
 <211> 6  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: etiqueta 6xHis sintética

<400> 21  
 His His His His His His  
 10 1 5

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

15 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 737 598 T3

<400> 22  
 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 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

<220>  
 <223> Descripción de 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

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

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

15 <220>  
 <223> Descripción de 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

20 <210> 25  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 25  
 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

30 <210> 26  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 737 598 T3

<220>

<223> Descripción de 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

5 <210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de 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

<210> 28

<211> 25

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<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

20

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de 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

<210> 30

30 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 737 598 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<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

- 5 <210> 31
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 10 <223> Descripción de 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

- 15 <210> 32
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 32

- 20 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

- 25 <210> 33
- <211> 24
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de 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

- 30 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln  
20

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

ES 2 737 598 T3

<220>

<223> Descripción de 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

5 <210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<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

<210> 36

<211> 28

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<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

20

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de 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

30

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial



**REIVINDICACIONES**

1. Proteína de fusión de Fc que comprende un Fc y una muteína de interleuquina-2 (IL-2) humana que comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº 1, en la que dicha muteína de IL-2 estimula células T reguladoras.
2. Proteína de fusión de Fc según la reivindicación 1, en la que Fc es un Fc de IgG1 humana o un Fc de IgG1 humana que comprende una o más mutaciones que alteran la función efectora de dicho Fc, tal como una sustitución en N297 y/o una sustitución o delección de la lisina C-terminal de dicho Fc de IgG humana.
3. Proteína de fusión de Fc según la reivindicación 1 o 2, en la que un conector conecta las partes Fc y de muteína de IL-2 humana de dicha proteína, tal como GGGGS (SEC ID nº 5), GGNGT (SEC ID nº 6), o YGNGT (SEC ID nº 7).
4. Proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la muteína de IL-2 comprende además una adición, sustitución o delección de aminoácido que altera la glucosilación de dicha proteína de fusión de Fc al expresarse en células de mamífero.
5. Proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha proteína de fusión de Fc comprende un dímero de Fc de dos muteínas de IL-2 o una única muteína de IL-2.
6. Proteína de fusión de Fc según la reivindicación 1, que presenta la secuencia SEC ID nº 18.
7. Ácido nucleico aislado codificante de la proteína de fusión de Fc según las reivindicaciones 1 a 6.
8. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 7, en el que el Fc es un Fc de IgG1 humana.
9. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 7 o la reivindicación 8 operablemente ligado a un promotor.
10. Célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que dicha célula huésped es una célula procariótica, tal como *E. coli* o una célula eucariótica, tal como una célula de mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).
11. Método para producir la proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar una célula huésped según la reivindicación 10 y recolectar la proteína de fusión de Fc a partir de dicho cultivo.
12. Muteína de IL-2 humana que comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1 o una proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización en un método *in vivo* de tratamiento de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria.
13. Muteína de IL-2 según la reivindicación 1 o proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización según la reivindicación 12, en la que la enfermedad es una enfermedad atópica, enfermedad autoinmunitaria paraneoplásica, inflamación de 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 SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis juvenil, artritis soriática juvenil, escleroderma 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 SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), dermatomiositis, artritis soriática, escleroderma, vasculitis, mielitis, poliomielitis, dermatomielitis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjögren, soriasis, soriasis de placas, soriasis guttata, soriasis inversa, soriasis pustular, soriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, vasculitis inducida por hepatitis C, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple (EM), pérdida espontánea del feto, enfermedades atópicas o enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, EPOC, rinosinusitis, rinosinusitis con pólipos, esofagitis eosinofílica, bronquitis eosinofílica, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis (p.ej., enfermedad de Graves), enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, rechazo del trasplante o daño renal.

fosfo-STAT5  
(IMF)

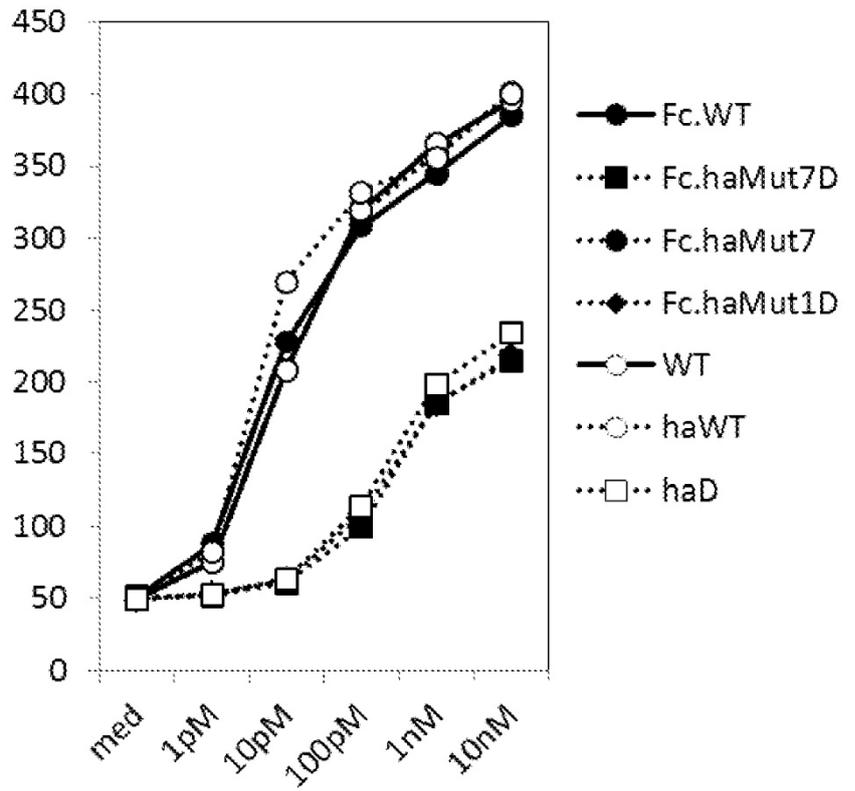


FIG. 1

FIG. 2A

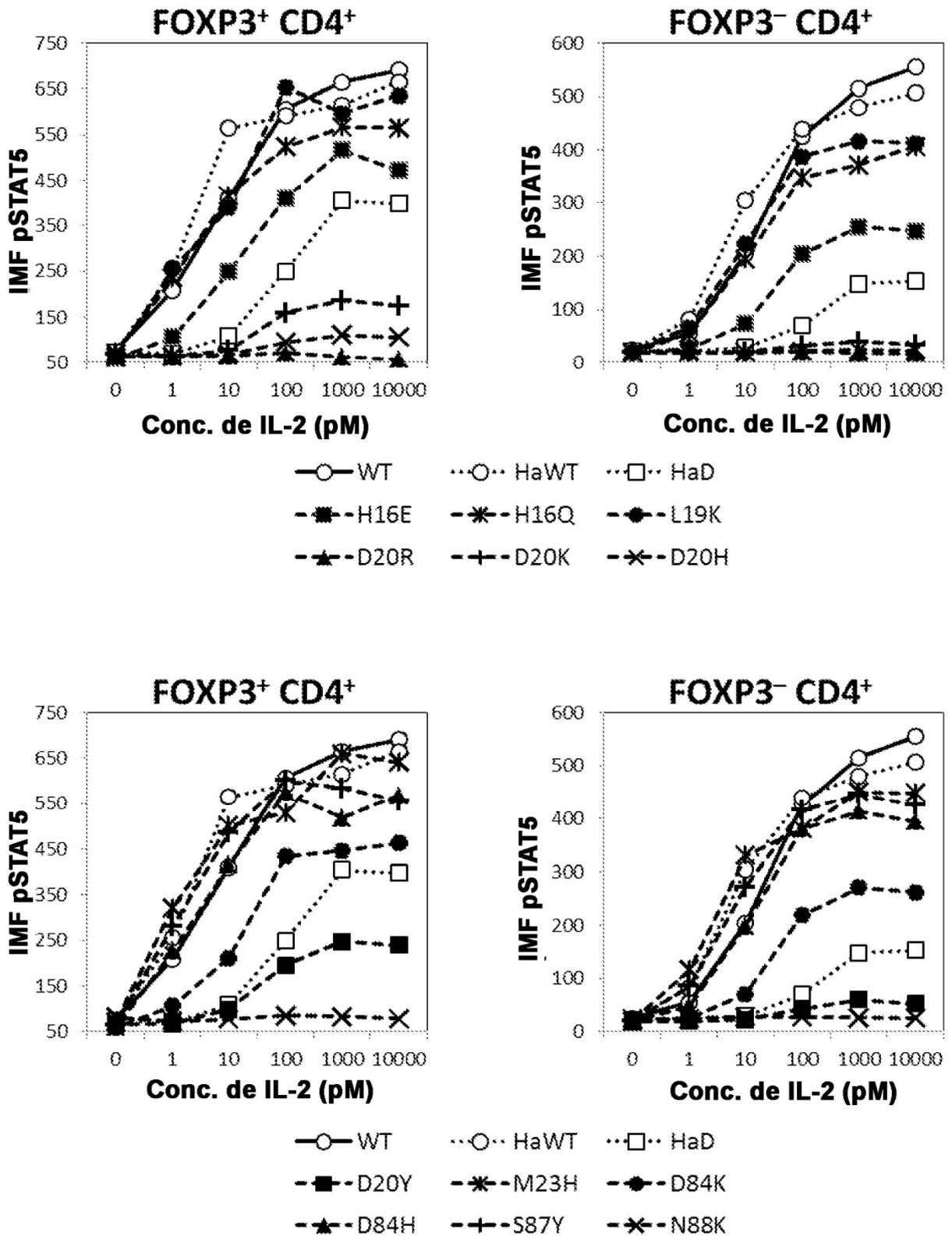
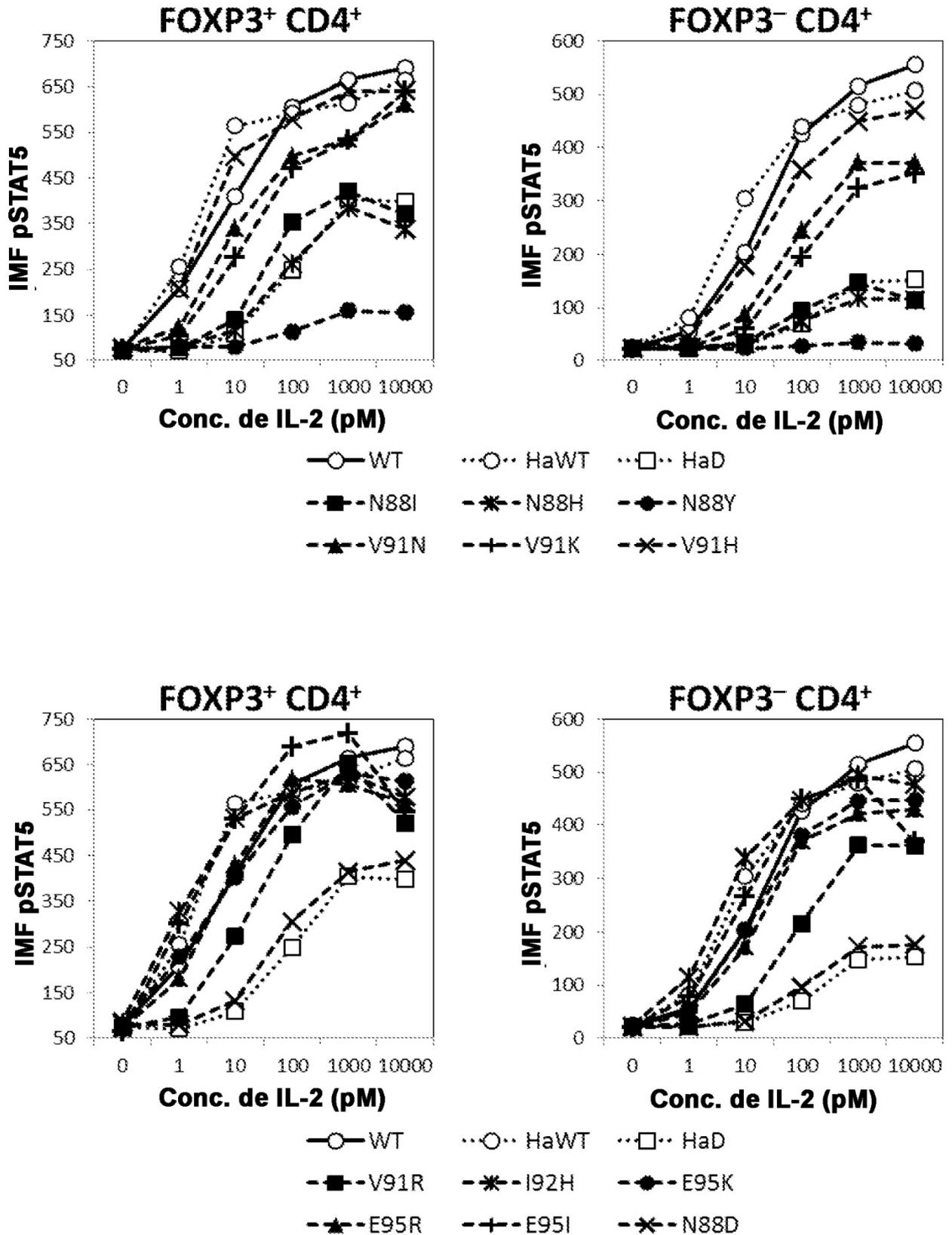


FIG. 2B



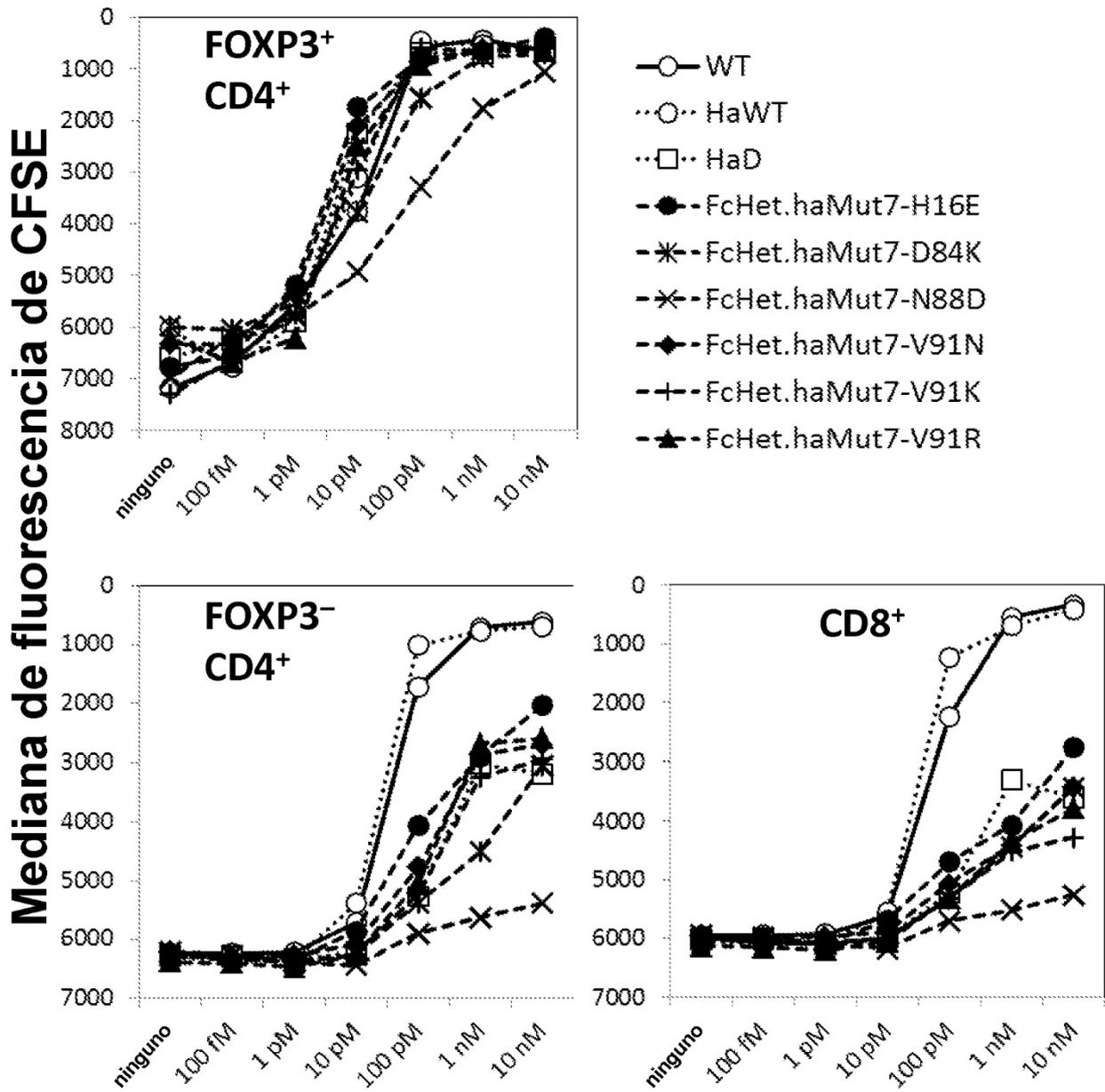


FIG. 3

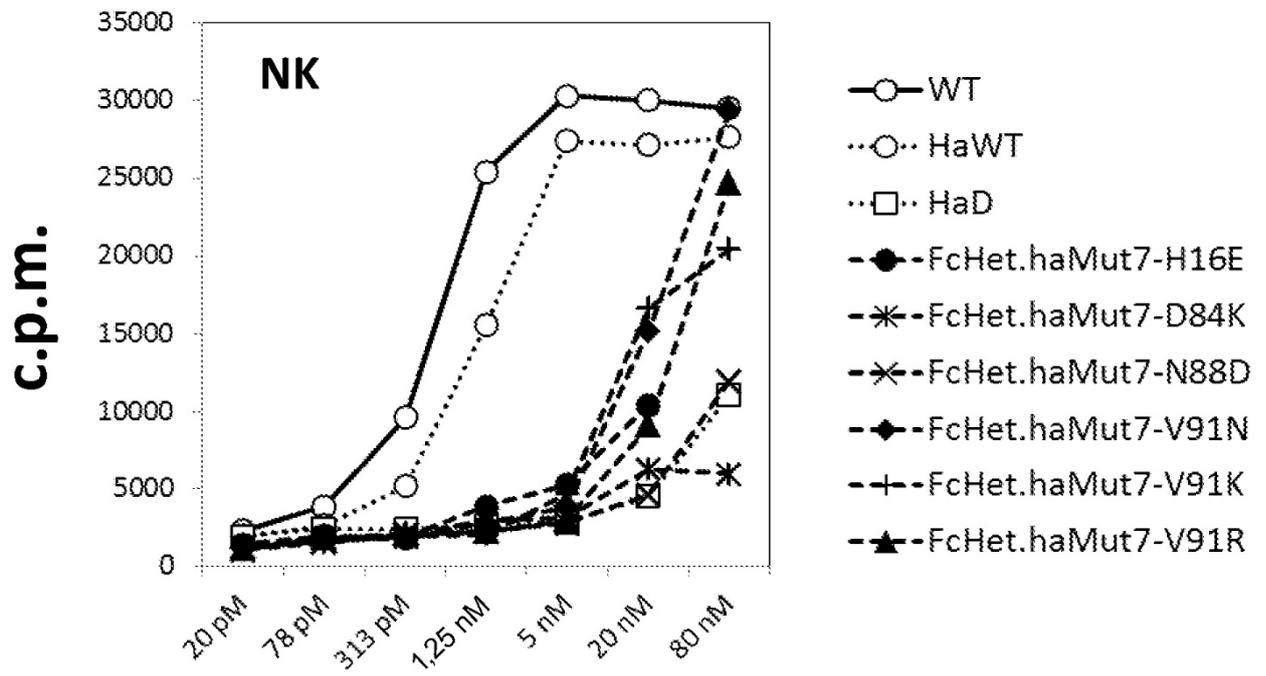


FIG. 4

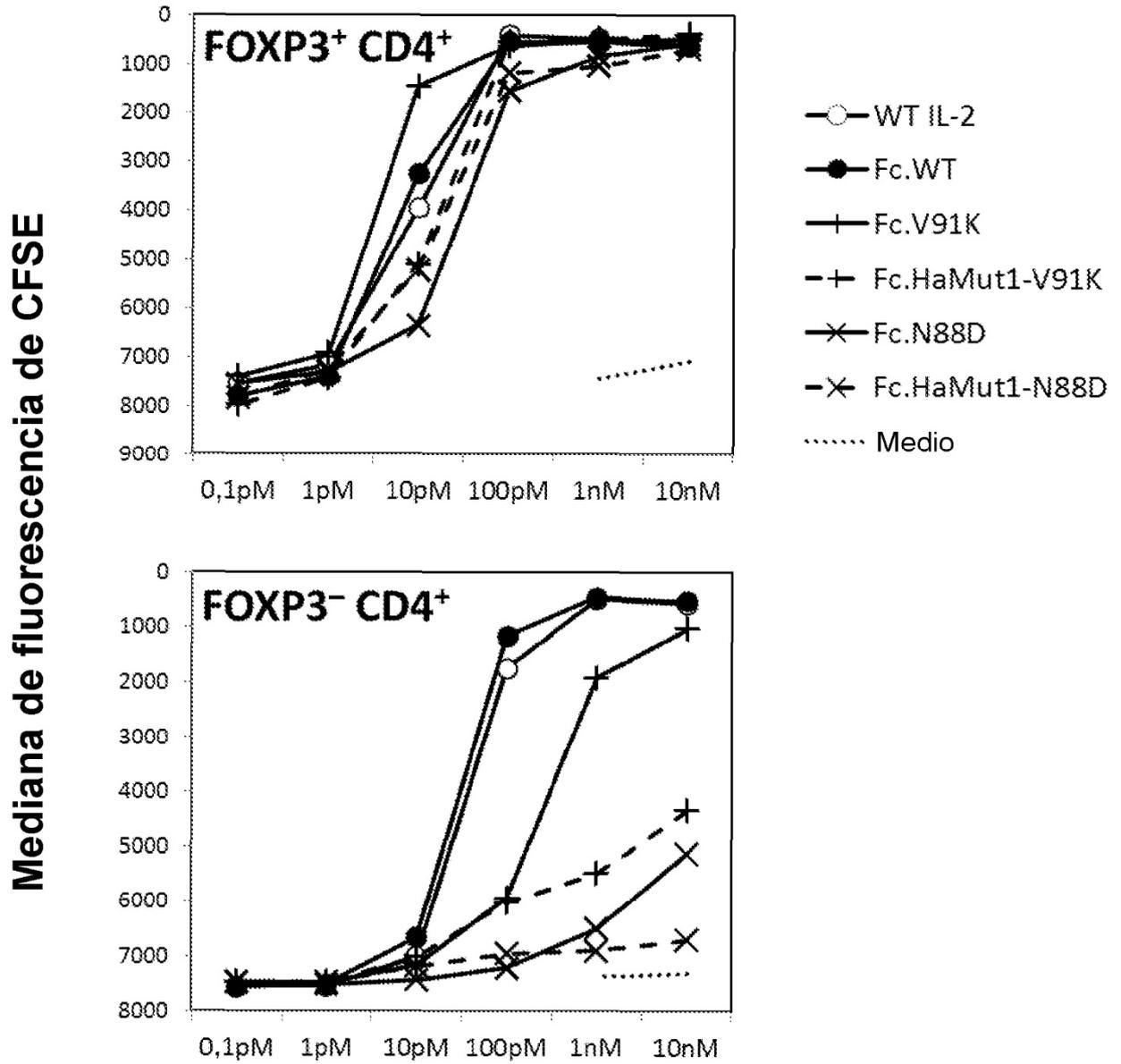


FIG. 5

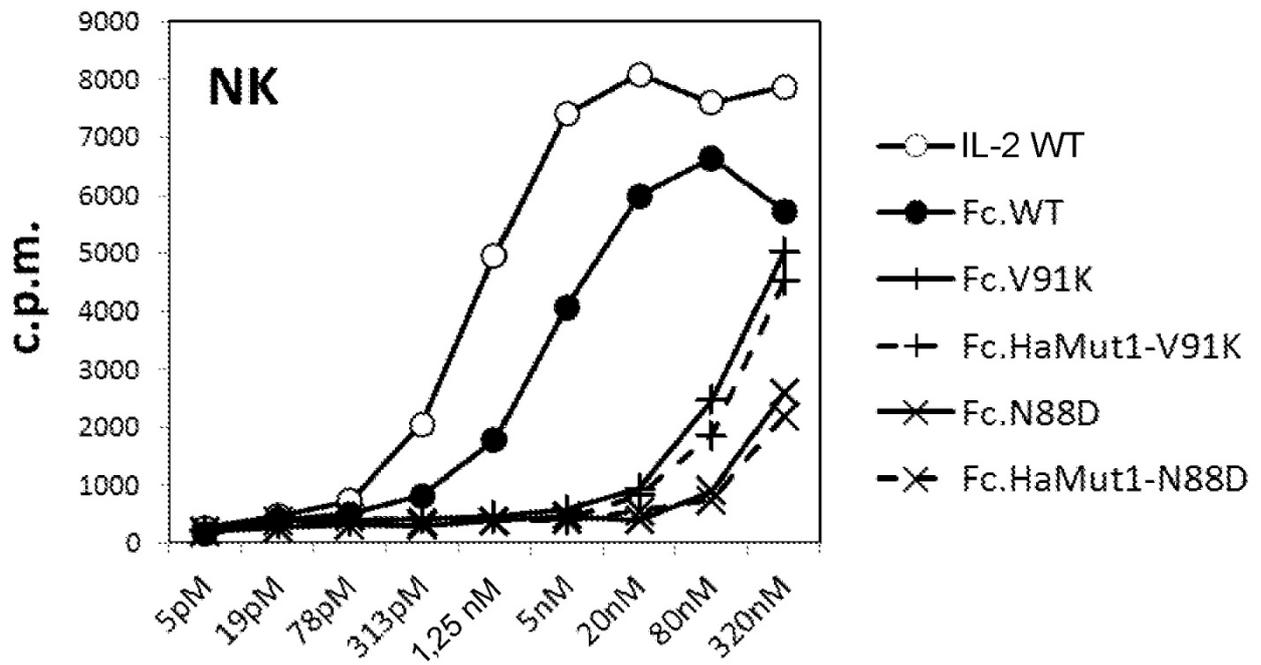


FIG. 6

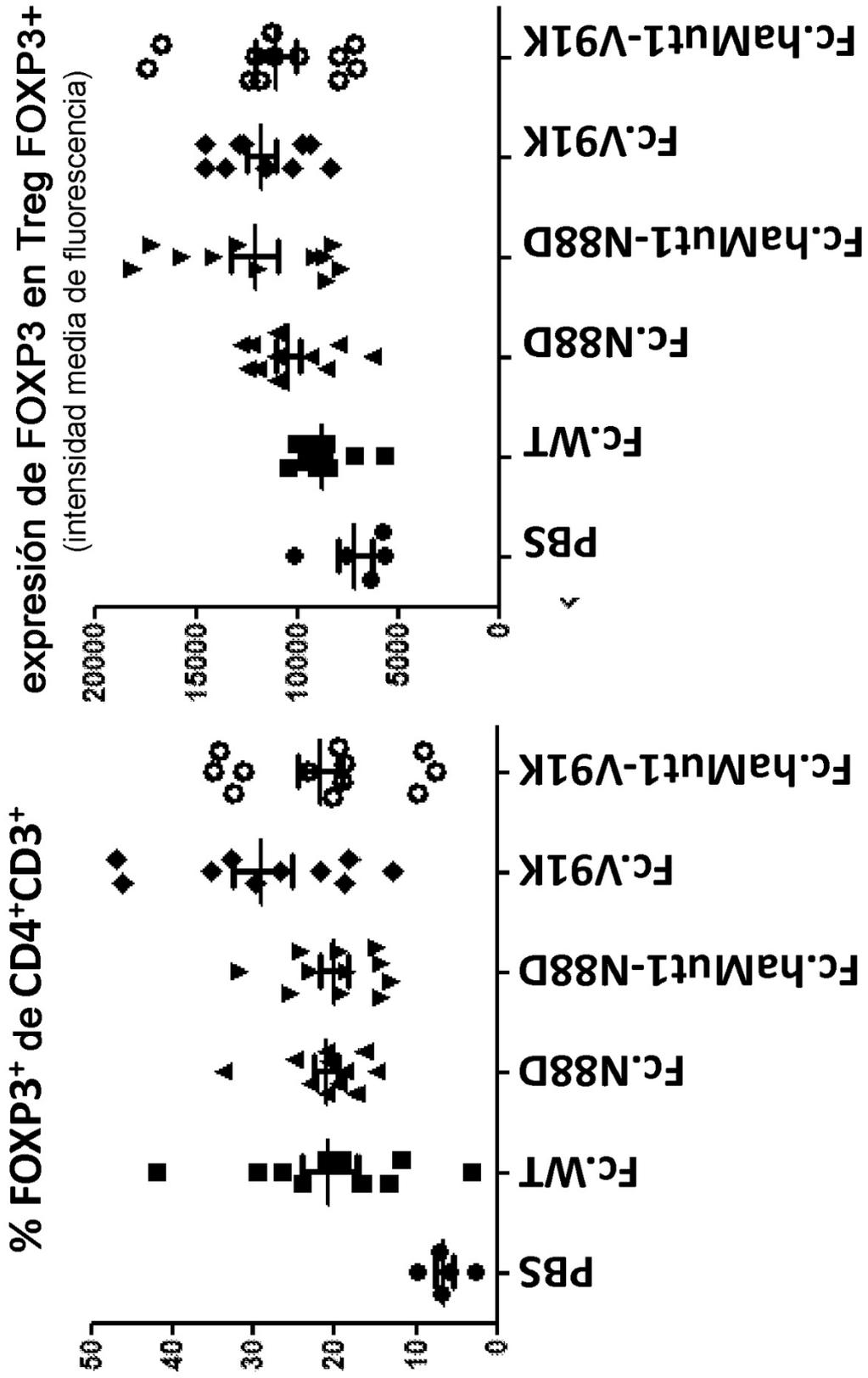


FIG. 7A

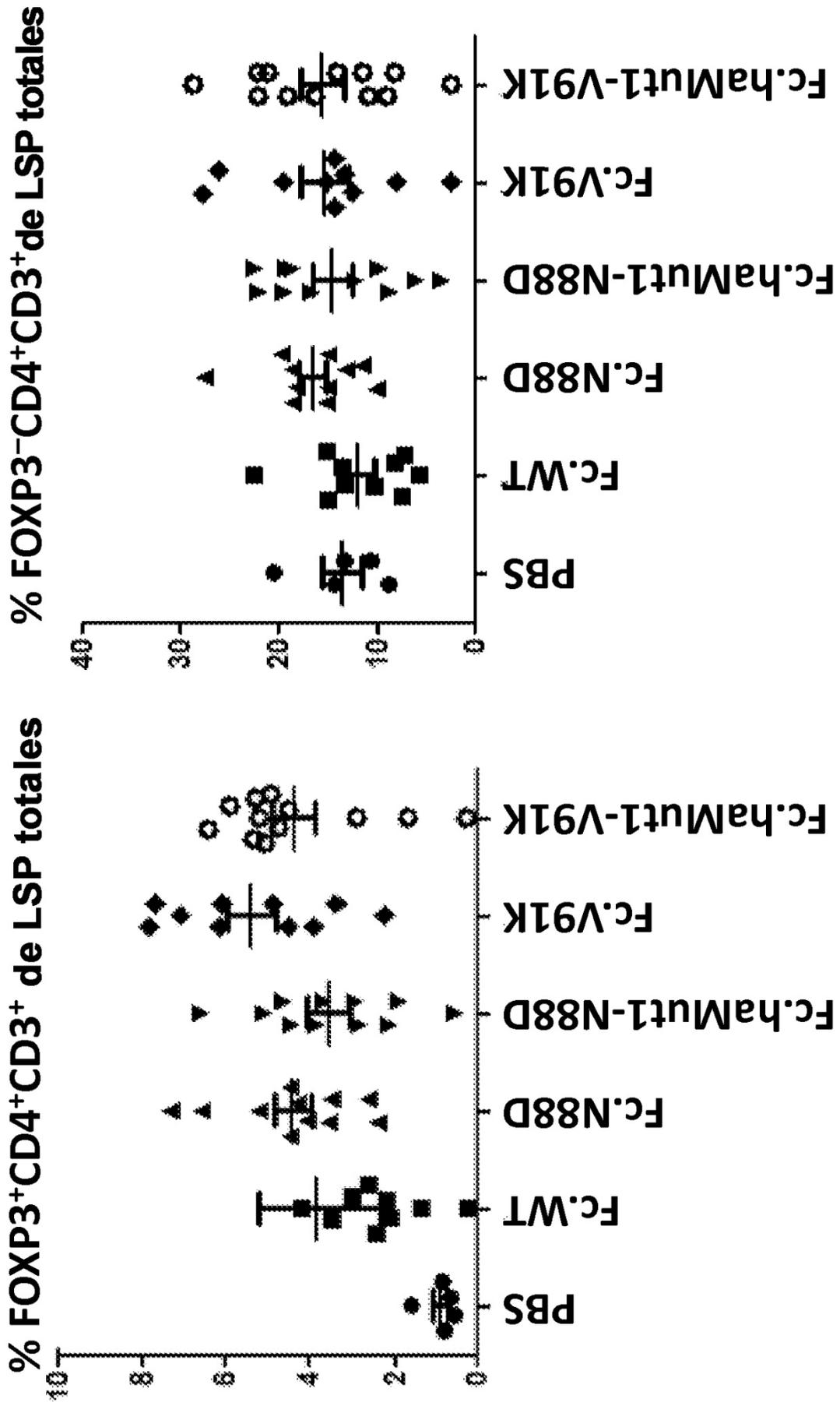


FIG. 7B

**FIG. 8**

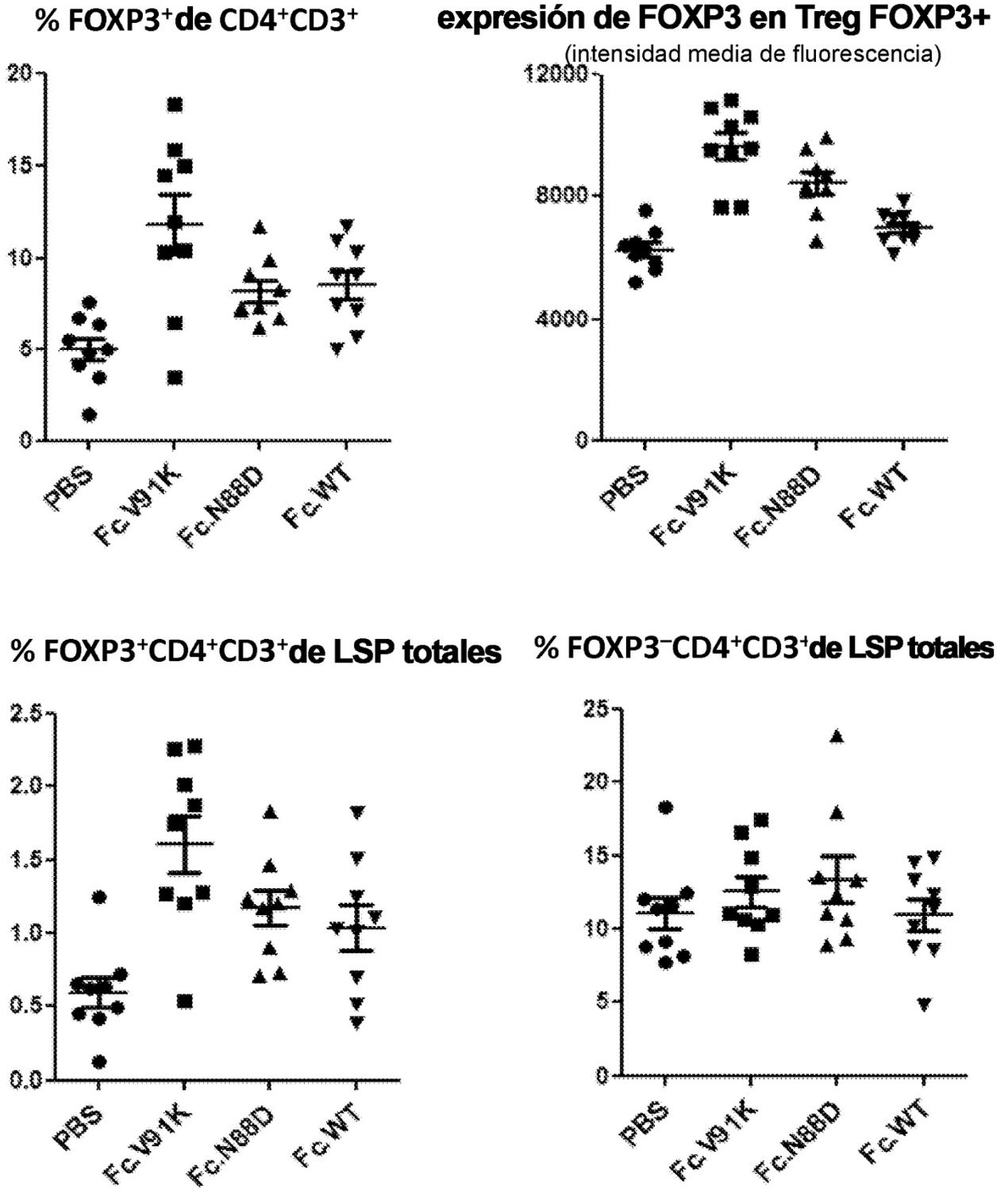


FIG. 9A

**selección de CD3+ CD4+  
T0 4 horas**

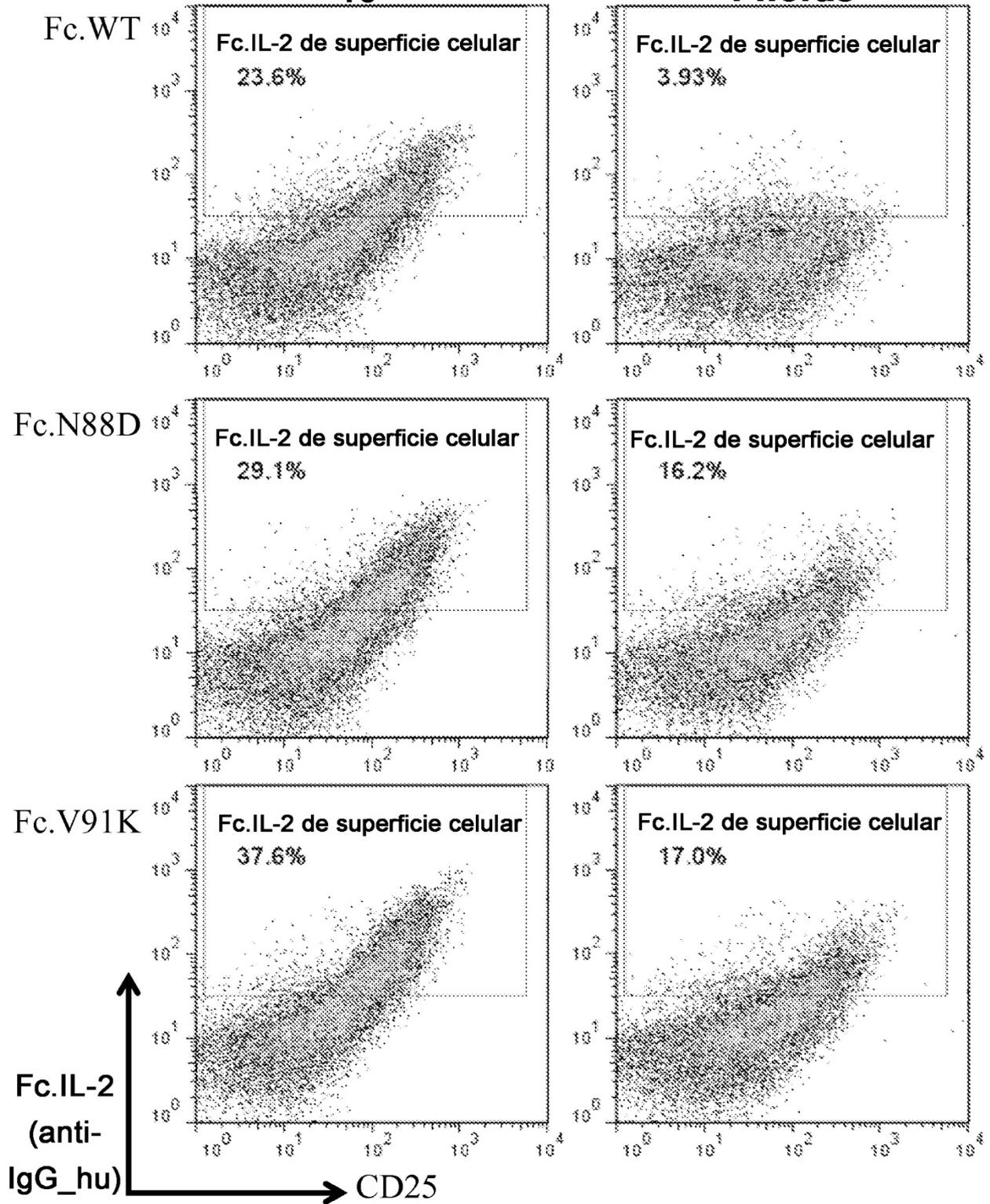
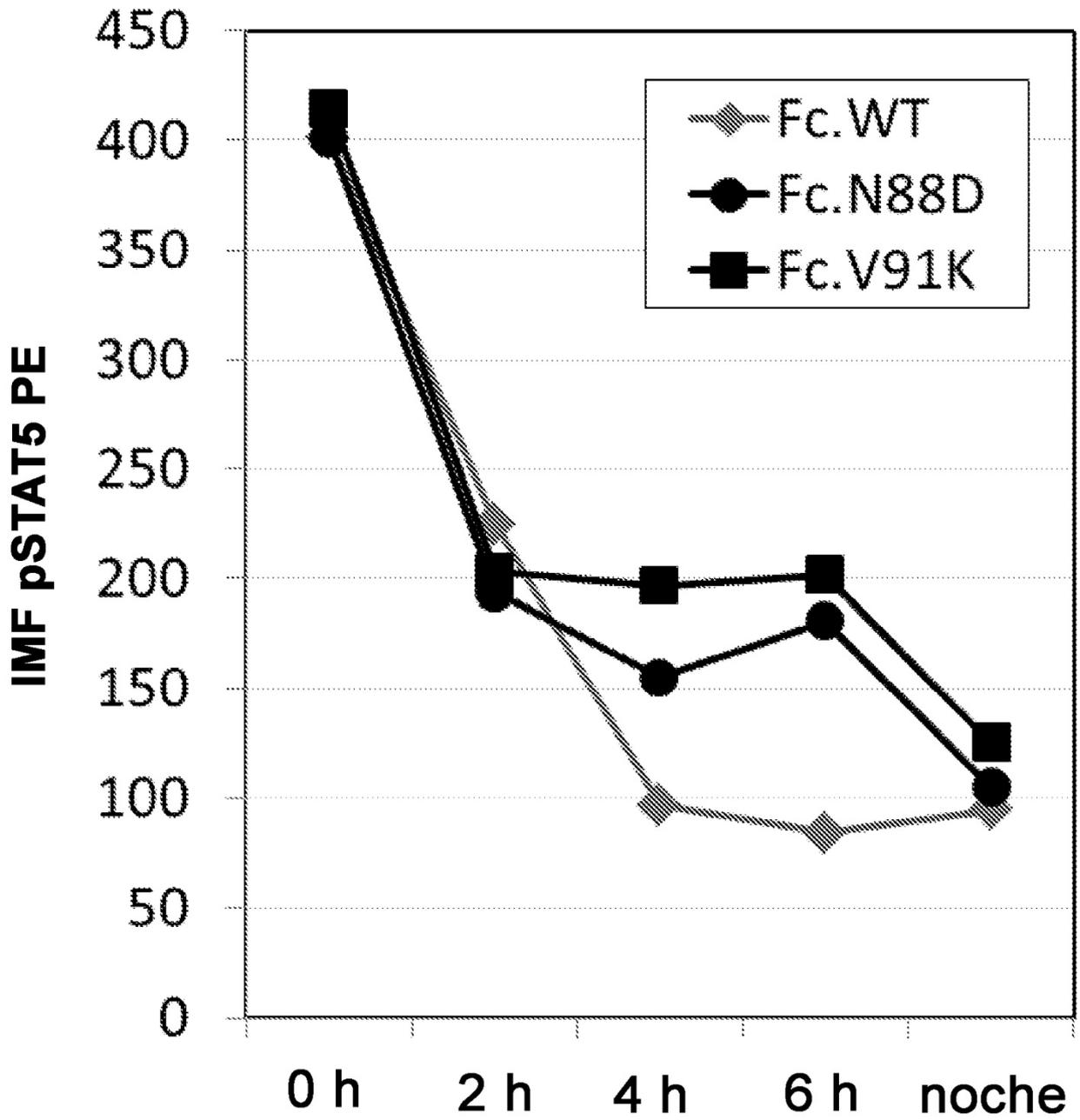
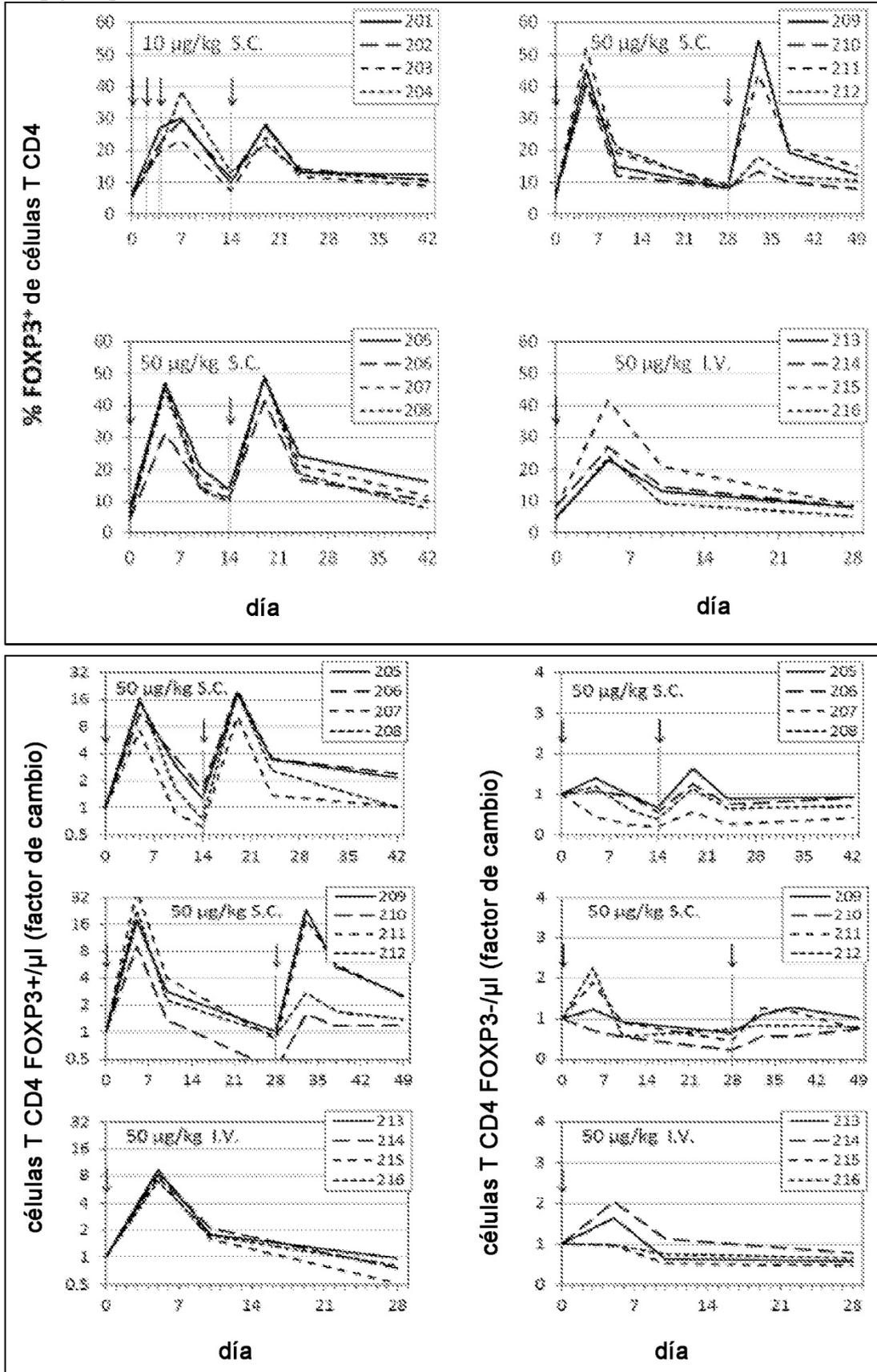


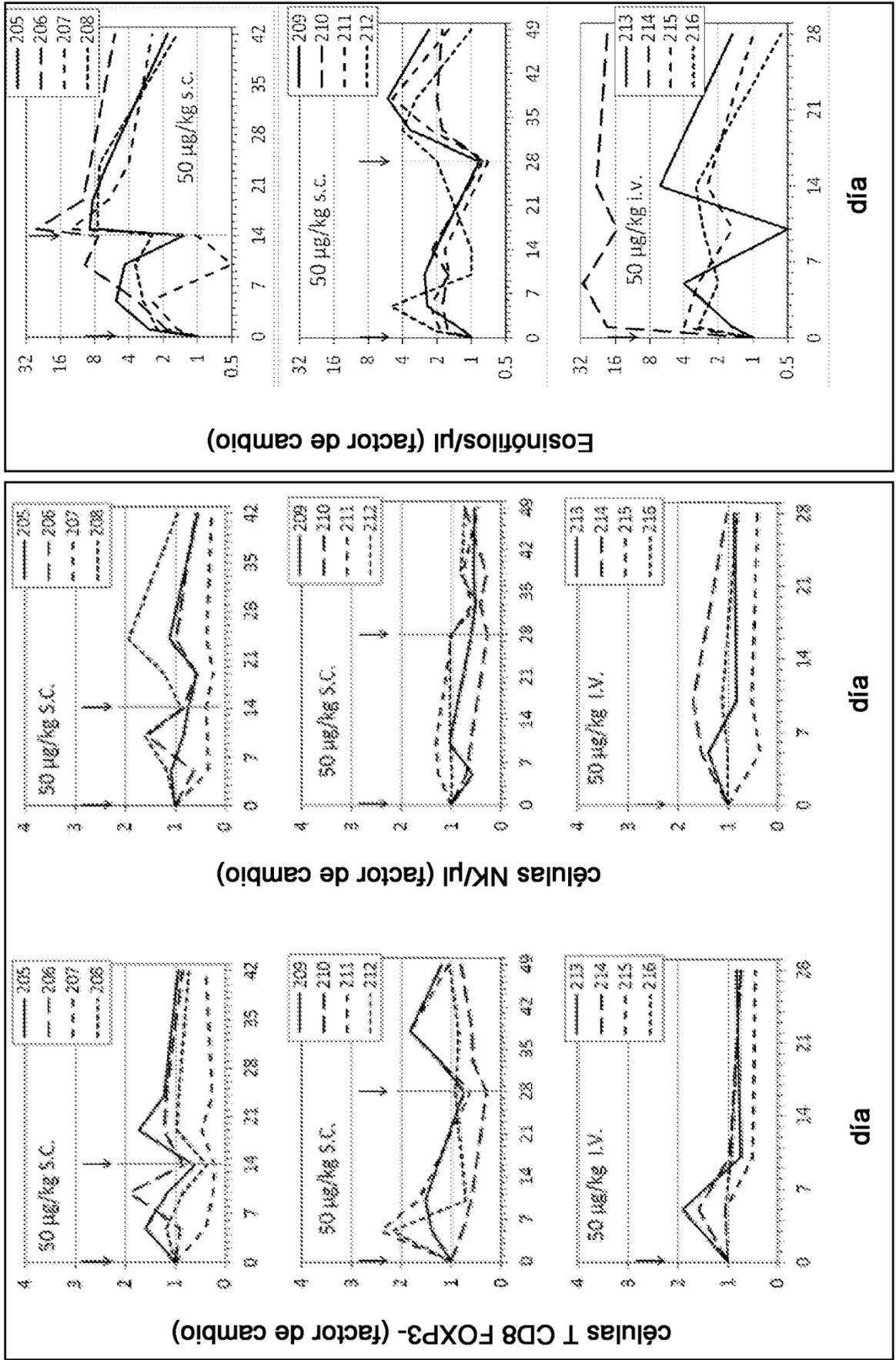
FIG. 9B



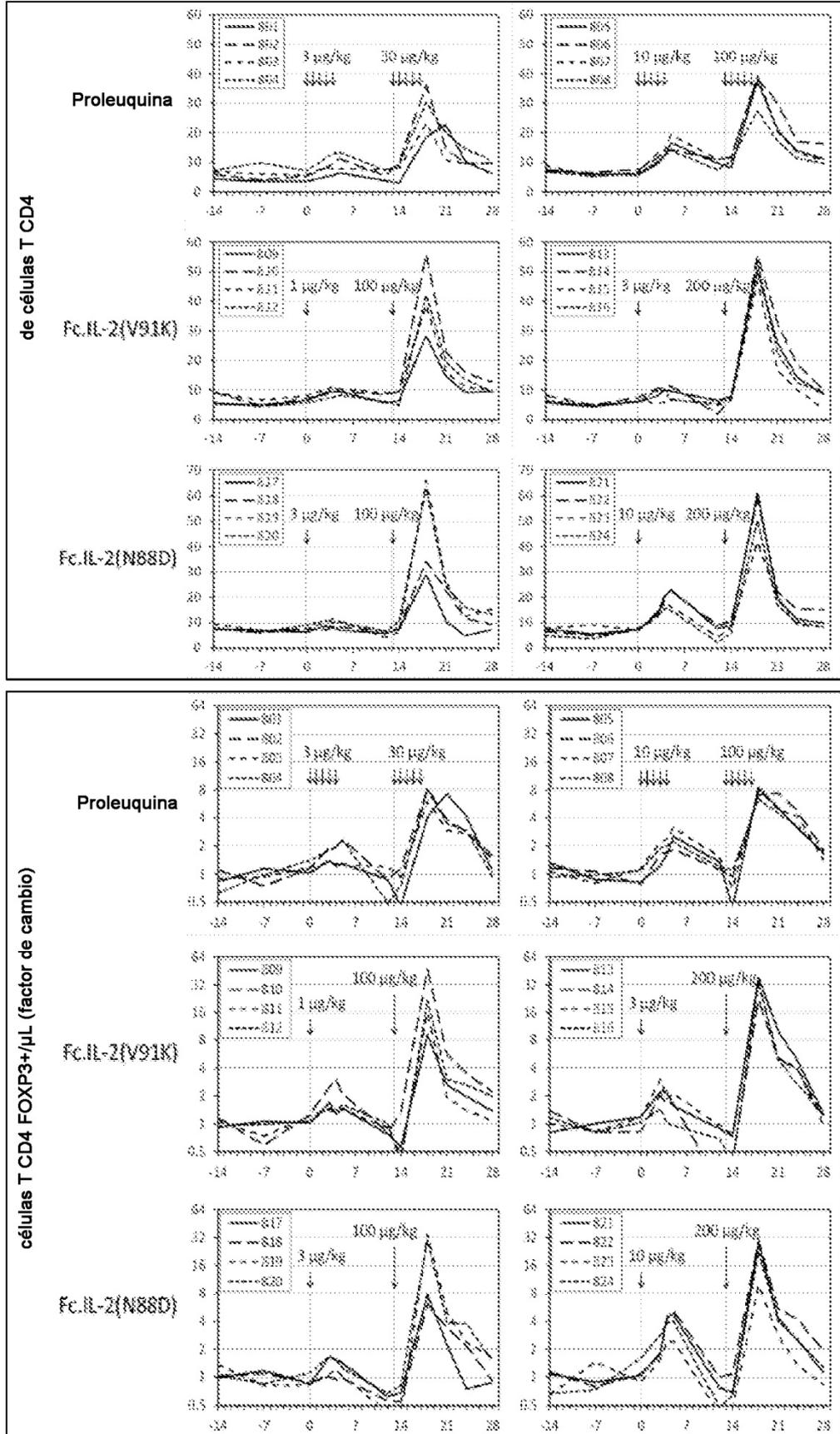
**FIG. 10A**



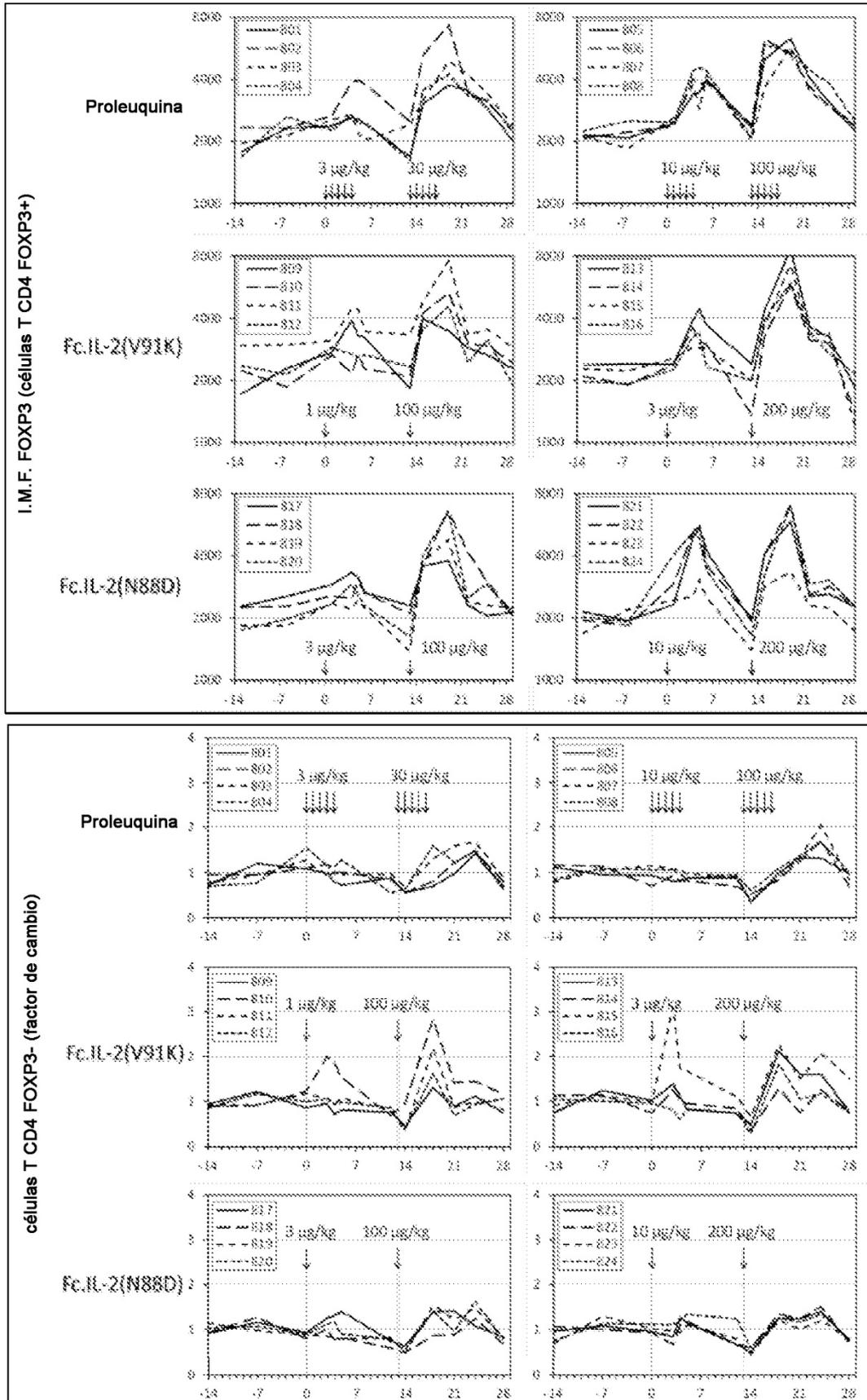
**FIG. 10B**



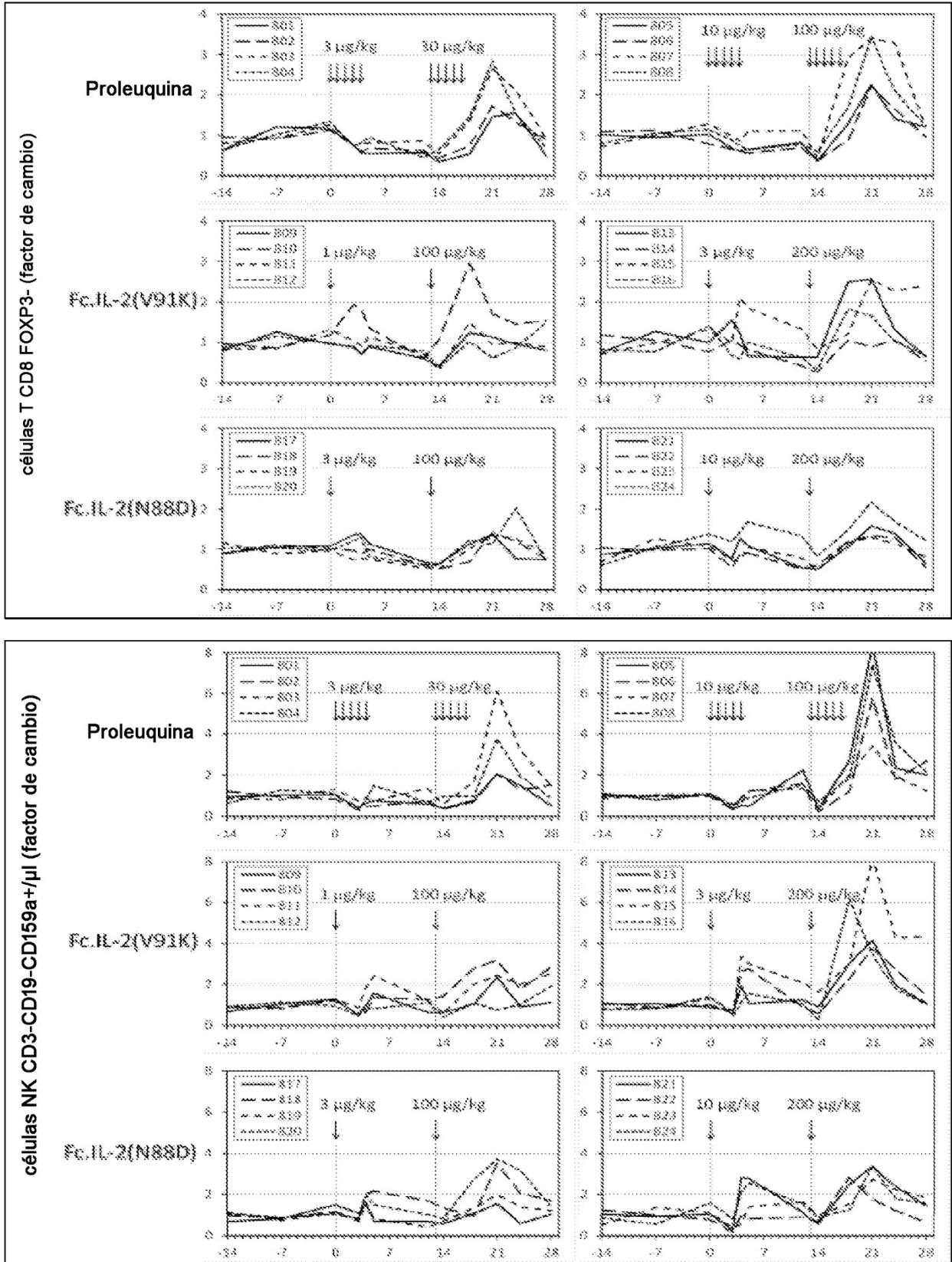
**FIG. 11A**



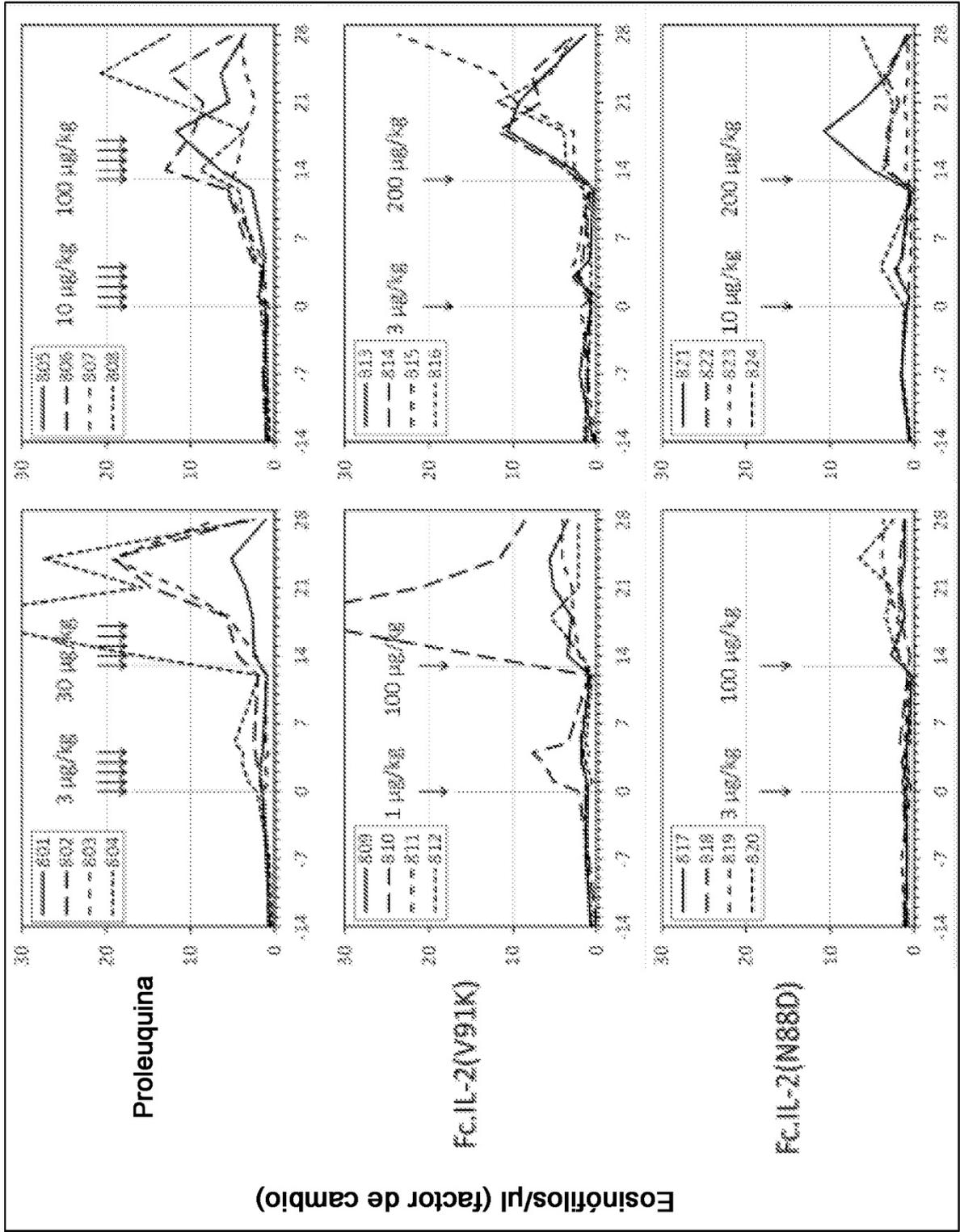
**FIG. 11B**



**FIG. 11C**



**FIG. 11D**



**FIG. 11E**

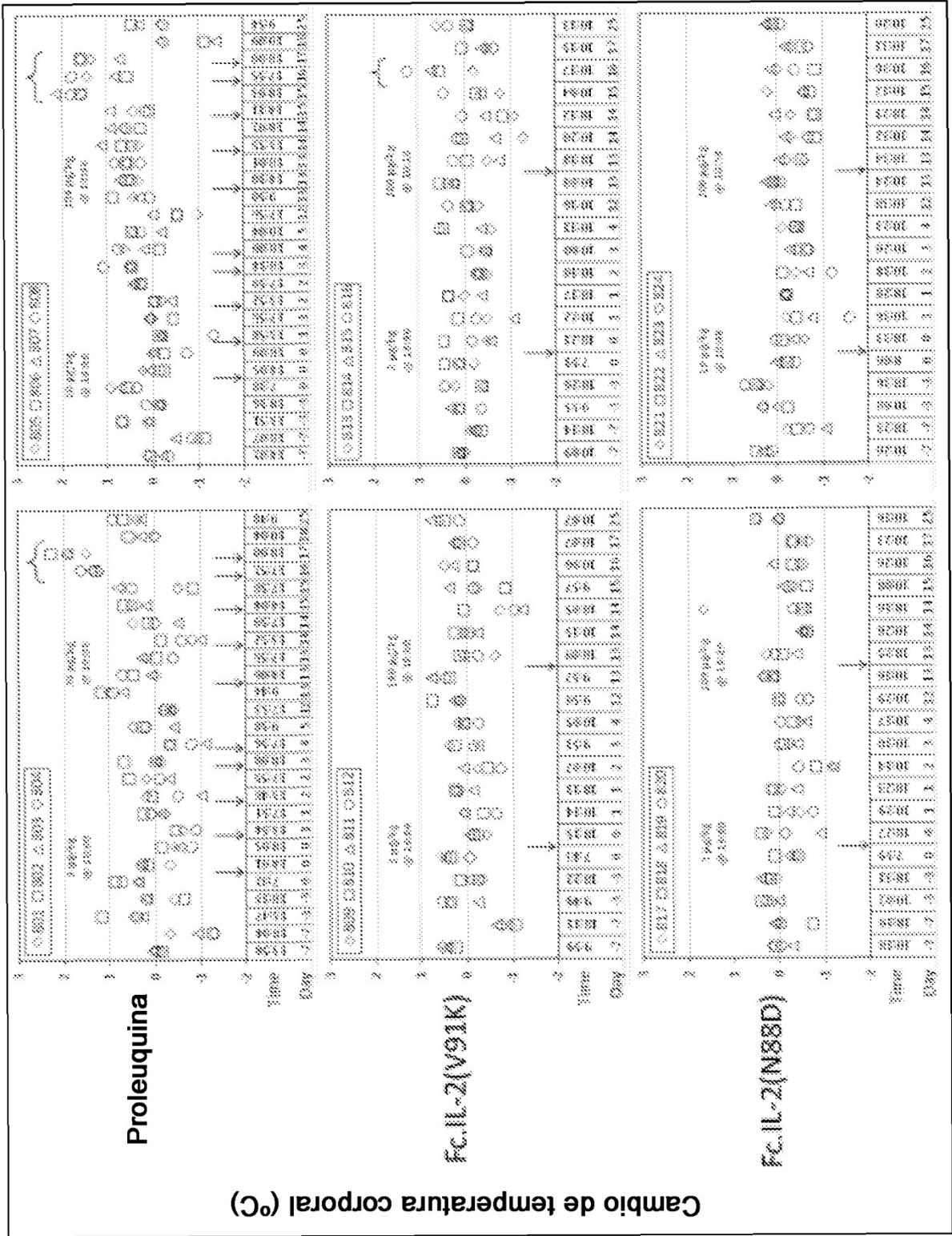


FIG. 11F

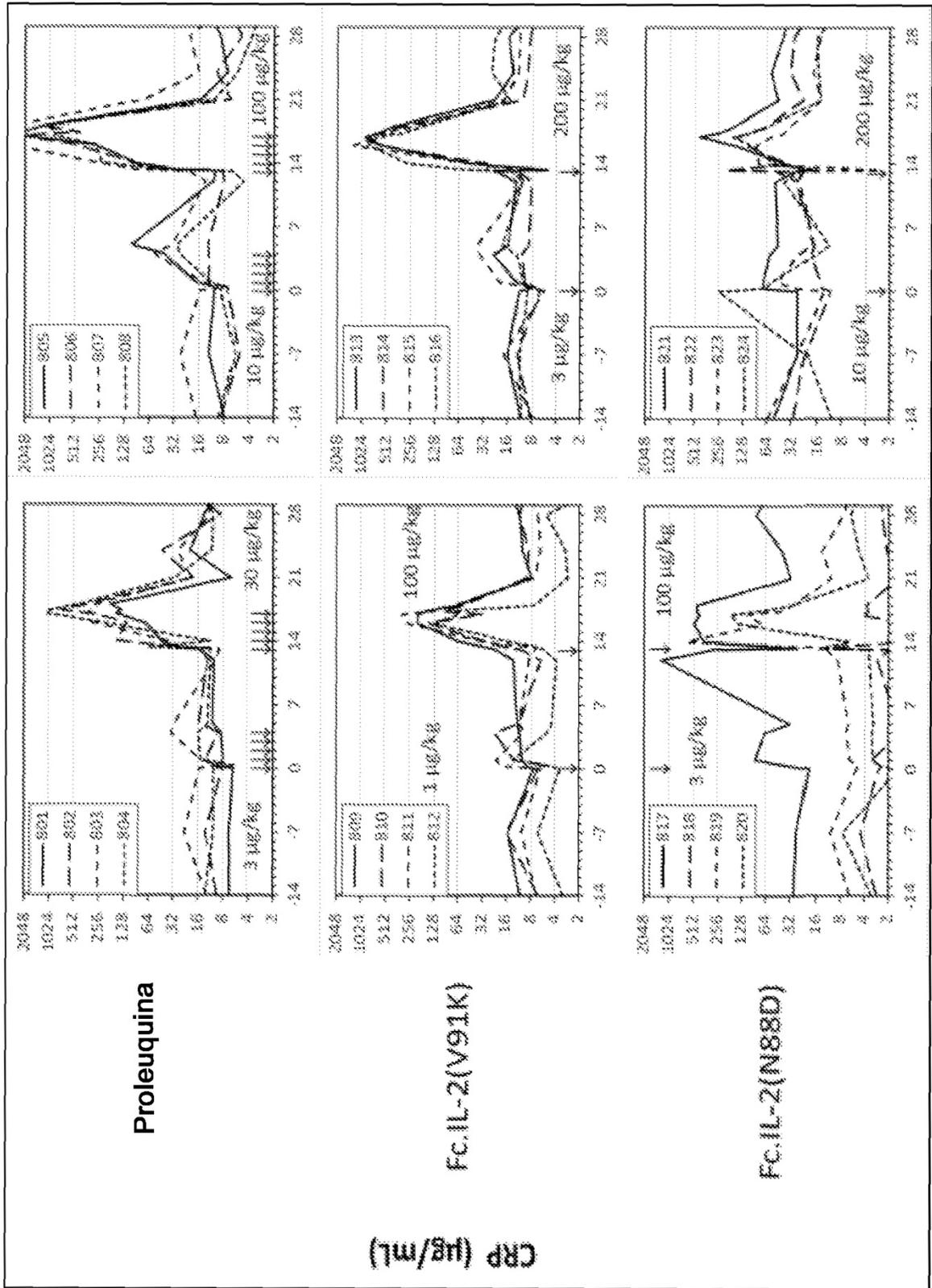


FIG. 12A

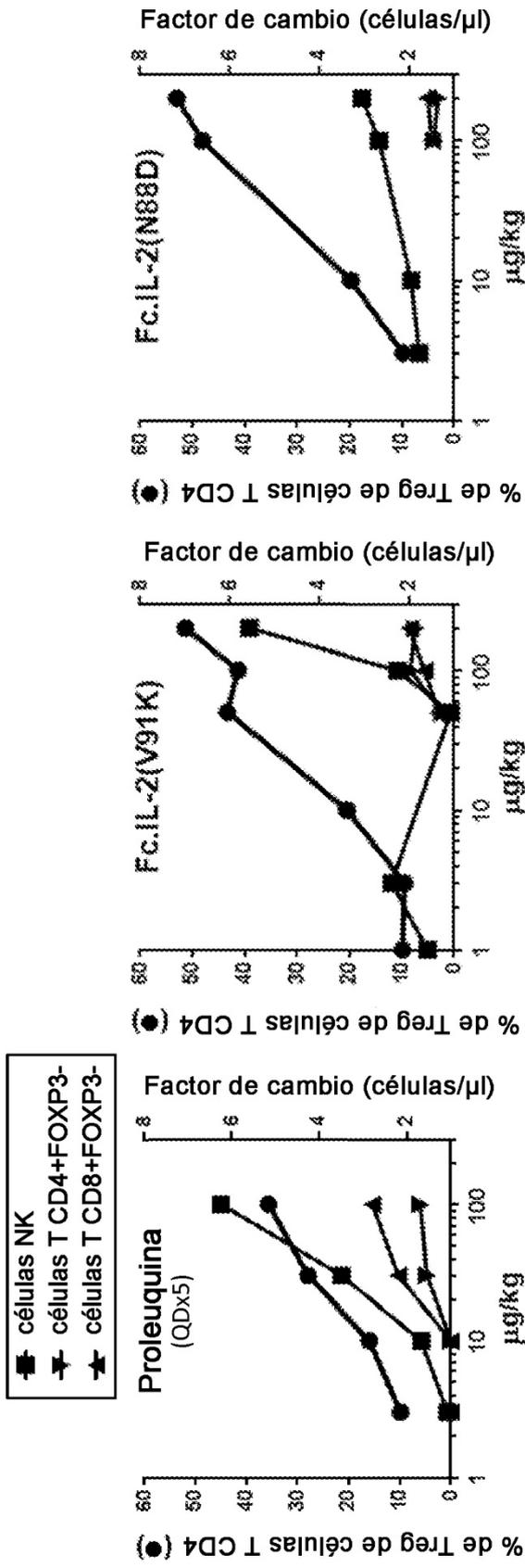


FIG. 12B

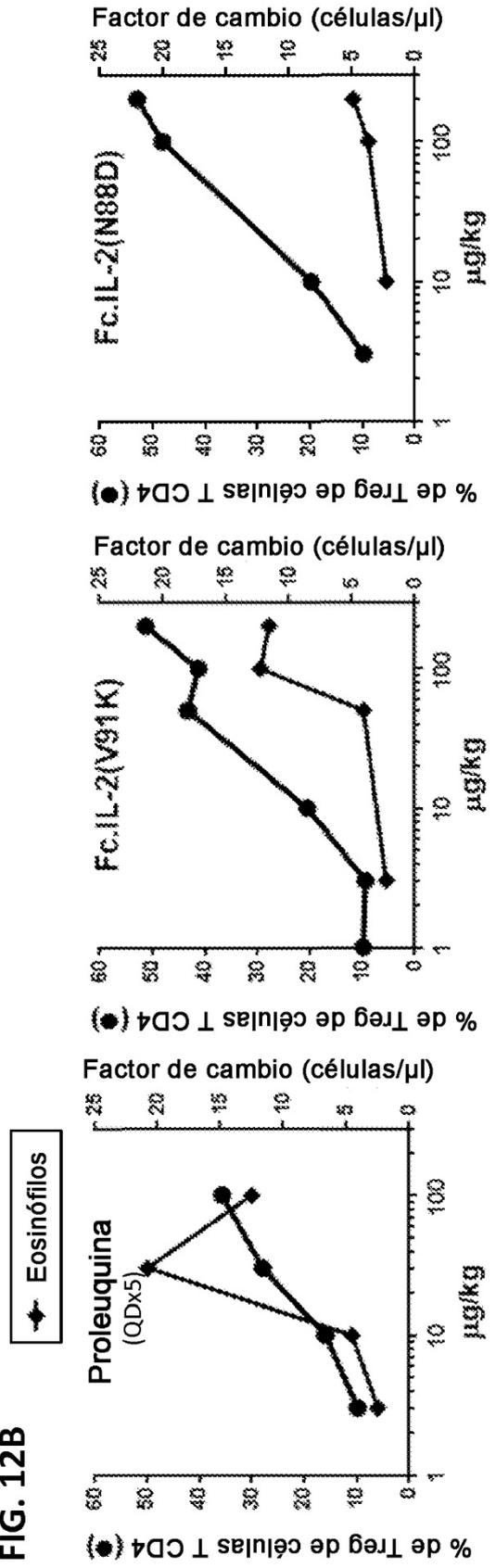


FIG. 12C

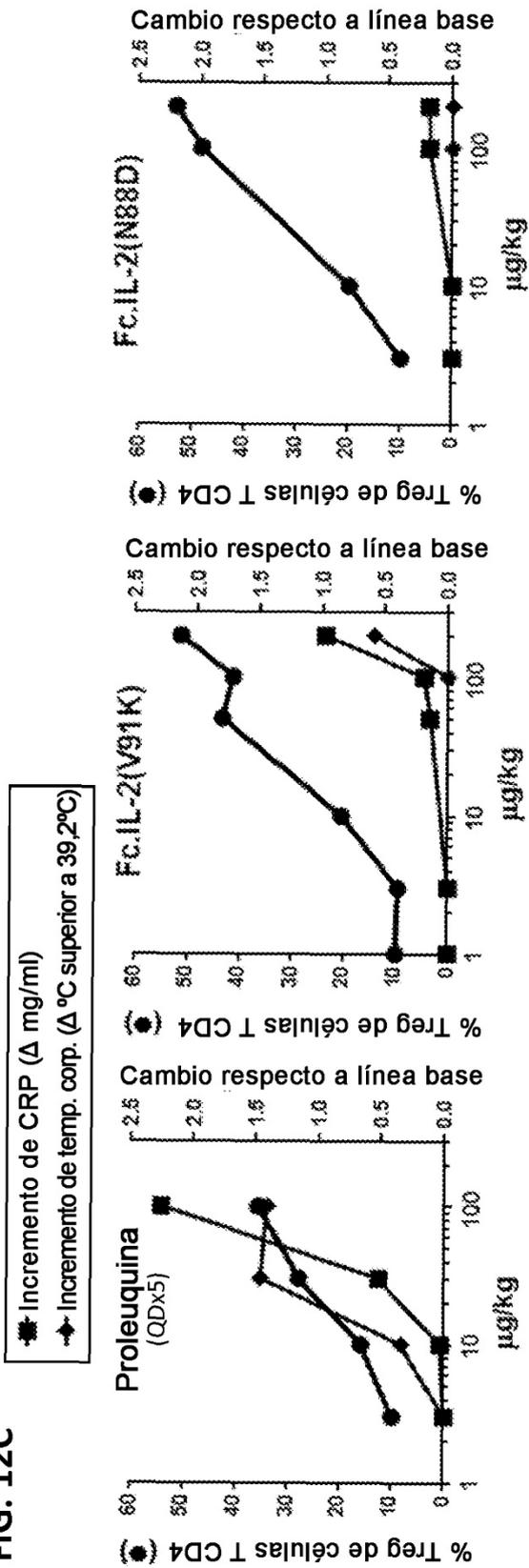


FIG. 12D

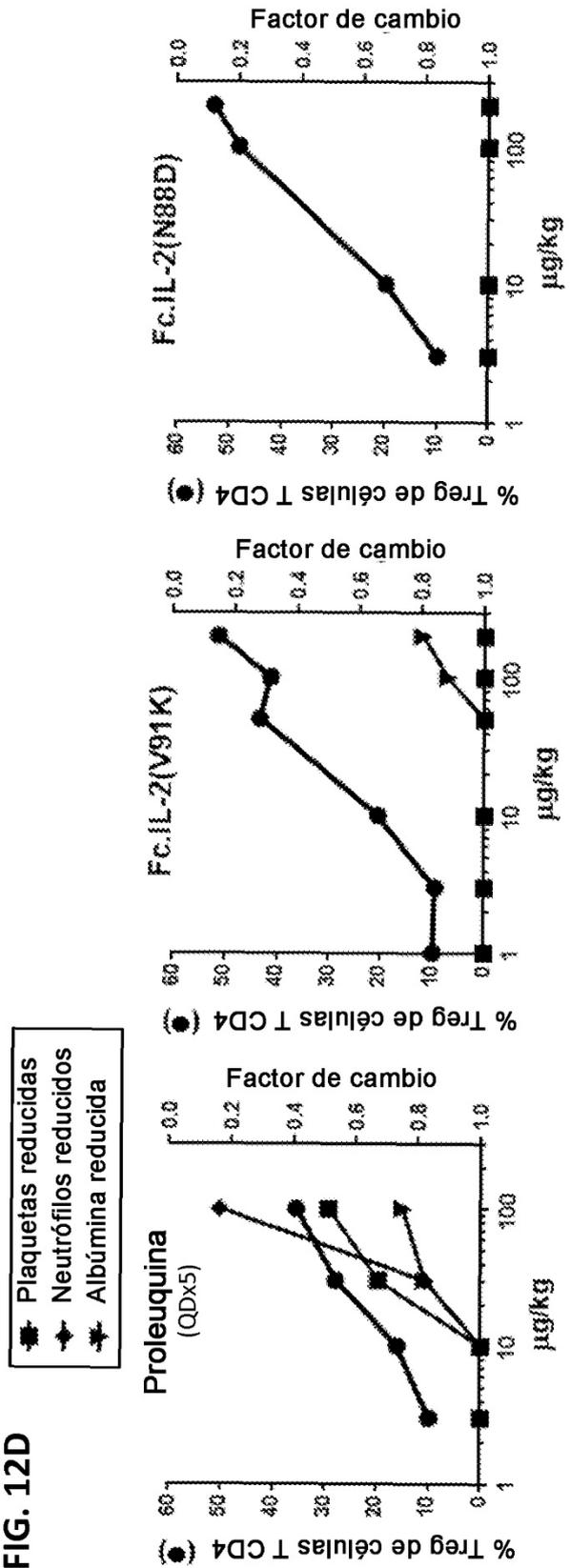


FIG. 13

