

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 198**

51 Int. Cl.:

C07K 14/55 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2015 PCT/US2015/041177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16014428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2015 E 15824955 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3172227**

54 Título: **Moléculas que selectivamente activan las células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

21.07.2014 US 201461999241 P

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

27.05.2020

73 Titular/es:

**DELINIA, INC. (100.0%)
400 Technology Square, 10th Floor
Cambridge, Massachusetts 02139, US**

72 Inventor/es:

GREVE, JEFFREY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 763 198 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

Moléculas que selectivamente activan las células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0001]** El sistema inmunológico debe ser capaz de discriminar entre auto y no auto. Cuando la auto/no auto discriminación falla, el sistema inmune destruye las células y tejidos del cuerpo y como resultado causa enfermedades autoinmunes. Las células T reguladoras suprimen activamente la activación del sistema inmune y previenen la autorreactividad patológica y la consiguiente enfermedad autoinmune. El desarrollo de fármacos y métodos para activar selectivamente las células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes es objeto de una intensa investigación y, hasta el desarrollo de la presente invención, no ha tenido éxito en gran medida.

15 **[0002]** Las células T reguladoras (Treg) son una clase de células T CD4+CD25+ que suprimen la actividad de otras células inmunes. Los Treg son fundamentales para la homeostasis del sistema inmune y juegan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia a los autoantígenos y en la modulación de la respuesta inmune a los antígenos extraños. Se ha demostrado que múltiples enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluidas la diabetes tipo 1 (T1D), el lupus eritematoso sistémico (LES) y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) tienen una deficiencia en el número de células Treg o en la función Treg. En consecuencia, existe un gran interés en el desarrollo de terapias que aumenten los números y/o la función de las células Treg.

20 **[0003]** Un enfoque de tratamiento para enfermedades autoinmunes que están siendo investigado es el trasplante de células Treg autólogas expandidas *ex vivo* (Tang, Q., et al, 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 3:1-15). Si bien este enfoque ha demostrado ser prometedor en el tratamiento de modelos animales de enfermedades y en varios ensayos clínicos en humanos en etapas tempranas, requiere un tratamiento personalizado con las propias células T del paciente, es invasivo y es técnicamente complejo. Otro enfoque es el tratamiento con dosis bajas de interleucina-2 (IL-2). Las células Treg expresan característicamente altos niveles constitutivos del receptor de IL-2 de alta afinidad, IL2R $\alpha\beta\gamma$, que está compuesto por las subunidades IL2RA (CD25), IL2RB (CD122) e IL2RG (CD132), y se ha demostrado que el crecimiento de células Treg es dependiente de IL-2 (Malek TR, et al., 2010, Immunity, 33: 153-65). Ensayos clínicos de tratamiento con dosis bajas de IL-2 de GVHD crónica (Koreth, J., et al., 2011, N Engl J Med., 365: 2055-66) y pacientes con vasculitis autoinmune asociada al VHC (Saadoun, D., et al., 2011, N Engl J Med., 365: 2067-77) han demostrado mayores niveles de Treg y signos de eficacia clínica. Se han iniciado nuevos ensayos clínicos que investigan la eficacia de IL-2 en muchas otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

35 **[0004]** La proleucina (comercializada por Prometheus Laboratories, San Diego, CA), la forma recombinante de IL-2 utilizada en estos ensayos, está asociada con una alta toxicidad. Proleukin está aprobado para el tratamiento del melanoma metastásico y el cáncer renal metastásico, pero sus efectos secundarios son tan graves que su uso solo se recomienda en un hospital con acceso a cuidados intensivos (<http://www.proleukin.com/assets/pdf/proleukin.pdf>). Hasta la caracterización más reciente de las células Treg, se consideraba que IL-2 era un estimulador del sistema inmunitario, activando las células T y otras células inmunes para eliminar las células cancerosas. Los ensayos clínicos de IL-2 en enfermedades autoinmunes han empleado dosis más bajas de IL-2 para apuntar a las células Treg, porque las células Treg responden a concentraciones más bajas de IL-2 que muchos otros tipos de células inmunes debido a su expresión de IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Klatzmann D, 2015 Nat Rev Immunol, 15: 283-94). Sin embargo, incluso estas dosis más bajas dieron lugar a problemas de seguridad y tolerabilidad, y los tratamientos utilizados han empleado inyecciones subcutáneas diarias, ya sea de forma crónica o en cursos intermitentes de tratamiento de 5 días. Por lo tanto, existe la necesidad de una terapia de enfermedad autoinmune que potencie el número y la función de las células Treg, que se dirija a las células Treg más específicamente que la IL-2, que sea más segura y tolerable, y que se administre con menos frecuencia.

50 **[0005]** Un enfoque para mejorar el índice terapéutico de la terapia basada en IL-2 es el uso de variantes de IL-2 que son selectivos para las células Treg relativas a otras células inmunes. Los receptores de IL-2 se expresan en una variedad de diferentes tipos de células inmunes, incluidas las células T, las células NK, los eosinófilos y los monocitos, y este amplio patrón de expresión probablemente contribuye a su efecto pleiotrópico sobre el sistema inmunitario y a una alta toxicidad sistémica. El receptor de IL-2 existe en tres formas: (1) el receptor de baja afinidad, IL2RA, que no señala; (2) el receptor de afinidad intermedio (IL2R $\beta\gamma$), compuesto por IL2RB e IL2RG, que se expresa ampliamente en células T convencionales (Tcons), células NK, eosinófilos y monocitos; y (3) el receptor de alta afinidad (IL2R $\alpha\beta\gamma$), compuesto por IL2RA, IL2RB e IL2RG, que se expresa de forma transitoria en las células T activadas y constitutivamente en las células Treg. Se han desarrollado variantes de IL-2 que son selectivas para IL2R $\alpha\beta\gamma$ en relación con IL2R $\beta\gamma$ (Shanafelt, AB, et al., 2000, Nat Biotechnol. 18: 1197-202; Cassell, DJ, et al., 2002, Curr Pharm Des., 8: 2171-83). Estas variantes tienen sustituciones de aminoácidos que reducen su afinidad por IL2RB. Debido a que IL-2 tiene una afinidad indetectable por IL2RG, estas variantes, por consiguiente, tienen una afinidad reducida por el complejo receptor IL2R $\beta\gamma$ y una capacidad reducida para activar las células que expresan IL2R $\beta\gamma$, pero conservan la capacidad de unirse a IL2RA y la capacidad de unirse y activar el complejo de receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$. Una de estas variantes, IL2/N88R (Bay 50-4798), se probó clínicamente como una versión de baja toxicidad de IL-2 como un estimulador del sistema inmune, según la hipótesis de que las células N2 que expresan IL2R $\beta\gamma$ son un contribuyente importante para toxicidad. Se demostró que Bay 50-4798 estimula selectivamente la proliferación de células T

activadas en relación con las células NK, y se evaluó en ensayos clínicos de fase I/II en pacientes con cáncer (Margolin, K., et. Al., 2007, Clin Cancer Res. 13: 3312-9) y Pacientes con VIH (Davey, RT, et. Al., 2008, J Interferon Cytokine Res., 28: 89-100). Estos ensayos mostraron que Bay 50-4798 era considerablemente más seguro y más tolerable que Proleukin, y también mostró que aumentó los niveles de células T CD4 + y células T CD4+CD25+ en pacientes. Sin embargo, el aumento en las células T CD4 + y las células T CD4+CD25+ no fueron indicativos de un aumento en las células Treg porque la identificación de Tregs requiere marcadores adicionales además a CD4 y CD25, y porque las células Treg son una fracción menor de las células CD4+CD25+. Después de estos ensayos, la investigación en el campo estableció más plenamente la identidad de las células Treg y demostró que las células Treg expresan selectivamente IL2R $\alpha\beta\gamma$ (revisado en Malek, TR, et al., 2010, Immunity, 33: 153-65). En base a esta nueva investigación, ahora se puede entender que los agonistas selectivos de IL2R $\alpha\beta\gamma$ deberían ser selectivos para las células Treg.

[0006] Un segundo enfoque para mejorar el índice terapéutico de una terapia basada en IL-2 es optimizar la farmacocinética de la molécula a máximamente estimular las células Treg. Los primeros estudios sobre la acción de IL-2 demostraron que la estimulación de IL-2 de la proliferación de células T humanas *in vitro* requería un mínimo de 5-6 horas de exposición a concentraciones efectivas de IL-2 (Cantrell, DA, et. Al., 1984, Science, 224: 1312-1316). Cuando se administra a pacientes humanos, IL-2 tiene una semivida plasmática muy corta de 85 minutos para la administración intravenosa y 3,3 horas de administración subcutánea (Kirchner, GI, et al., 1998, Br J Clin Pharmacol. 46: 5-10). Debido a su corta vida media, mantener la IL-2 circulante en o por encima del nivel necesario para estimular la proliferación de células T durante la duración necesaria requiere altas dosis que dan como resultado niveles máximos de IL-2 significativamente superiores a la CE50 para las células Treg o requerirá frecuente administración (FIGURA 1). Estos altos niveles máximos de IL-2 pueden activar los receptores $\beta 2$ de IL2R y tener otros efectos no deseados o adversos. Un análogo de IL-2 con una vida media circulante más larga que IL-2 puede alcanzar una concentración de fármaco diana durante un período de tiempo especificado a una dosis menor que IL-2 y con niveles máximos más bajos. Tal análogo de IL-2, por lo tanto, requerirá dosis más bajas o una administración menos frecuente que IL-2 para estimular eficazmente las células Treg. De hecho, en los monos cynomolgus a los que se les administró una proteína de fusión IgG-IL2 con una vida media circulante de 14 horas, se estimuló un aumento mucho más robusto en Tregs en comparación con una dosis equimolar de IL-2 (Bell, et al., 2015, J Autoimmun 56: 66-80). La administración subcutánea menos frecuente de un fármaco IL-2 también será más tolerable para los pacientes. Un producto terapéutico con estas características se traducirá clínicamente en una eficacia farmacológica mejorada, una toxicidad reducida y un mejor cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

[0007] Un enfoque para extender la vida media de las proteínas terapéuticas es para fundir la porción terapéuticamente activa de la molécula a otra proteína, tal como la región Fc de IgG, para aumentar la vida media en circulación. La fusión de proteínas terapéuticas con IgG Fc logra esto al aumentar el radio hidrodinámico de la proteína, reduciendo así el aclaramiento renal, y a través del reciclaje de la proteína de fusión por medio del Receptor de Fc Neonatal (FcRn), prolongando así la vida media circulante. La fusión de proteínas terapéuticas con albúmina (Sleep, D., et. Al., 2013, Biochem Biophys Acta., 1830: 5526-34) y proteínas de polímeros de aminoácidos no inmunogénicos (Schlapsch, M., et. Al., 2007, Protein Eng Des Sel. 20: 273-84; Schellenberger, V., et al., 2009, Nat Biotechnol. 27: 1186-90) también se han empleado para aumentar la vida media circulante. Sin embargo, la construcción de tales proteínas de fusión de una manera que asegure una actividad biológica robusta del compañero de fusión del agonista selectivo de IL2 puede ser impredecible, especialmente en el caso de un agonista selectivo de IL-2, que es una proteína pequeña que es defectuosa en la unión a uno de las subunidades del receptor y que deben ensamblar un complejo de tres subunidades del receptor para activar el receptor (Wang, X., et al., 2005, Science 310: 1159-63).

[0008] Otros investigadores han creado diversas proteínas de fusión IL-2, utilizando de tipo silvestre IL-2 o IL-2 con una sustitución C125S para promover la estabilidad. Morrison y colegas (Penichet, ML, et al., 1997, Hum Antibodies. 8: 106-18) crearon una proteína de fusión con IgG fusionada con IL-2 de tipo silvestre para aumentar la vida media circulante de IL-2 y para dirigir IL-2 a antígenos específicos con el fin de potenciar la respuesta inmune al antígeno. Esta proteína de fusión consistía en una molécula de anticuerpo intacta, compuesta de cadenas pesadas (H) y ligeras (L), en donde el resto de la cadena HN-terminal se fusionó con un resto de proteína IL-2 C-terminal. Esta proteína de fusión IgG-IL-2 poseía funciones efectoras de Fc. Las funciones efectoras clave de las proteínas IgG Fc son la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La proteína de fusión IgG- IL-2 fue altamente activa en un bioensayo de IL-2 y se demostró que posee actividad CDC. Por lo tanto, Penichet et. Alabam. enseñó el uso de proteínas de fusión anticuerpo-IL2 para dirigir la actividad de IL-2 a antígenos reconocidos por el anticuerpo, con el propósito de potenciar las respuestas inmunes humorales y mediadas por células al antígeno. De manera similar, Gillies y sus colegas han construido una serie de proteínas de fusión IgG-IL-2 para la inmunoterapia del cáncer, utilizando la porción de anticuerpo de la proteína de fusión para atacar los antígenos tumorales, y la porción de IL-2 para estimular la respuesta inmune a células tumores (revisadas en Sondel, PM, et al., 2012, Antibodies, 1:149-71). El documento WO 2008/003473 describe composiciones y métodos para mejorar la eficacia de las respuestas inmunes mediadas por IL-2. Estas enseñanzas son bastante distintas de la presente tecnología inventiva, en donde un agonista selectivo de IL-2, que promueve el crecimiento y la actividad de las células Treg inmunosupresoras, se fusiona con un resto de proteína efectora deficiente en la función efectora con el fin de aumentar la exposición sistémica.

[0009] Las proteínas de fusión Strom y sus colegas han construido con IL-2 fusionada al extremo N de una proteína

Fc con el propósito de eliminar la activación de las células T que expresan el receptor de alta afinidad de IL-2 (Zheng, XX, et al., 1999, J Immunol. 1999, 163: 4041-8). Se demostró que esta proteína de fusión inhibe el desarrollo de diabetes autoinmune en un modelo de ratón de transferencia de células T de T1D. Se demostró que la proteína de fusión IL2-Fc inhibe la función de las células T promotoras de enfermedad de ratones NOD hembra susceptibles a TID cuando se trasplanta en ratones NOD machos menos susceptibles a enfermedad. Ellos también demostraron que la proteína de fusión IL-2-Fc podría matar las células que expresan la alta afinidad de IL-2 receptor *in vitro*. Estos investigadores compararon además las proteínas de fusión IL2-Fc construidas a partir de una Fc derivada de una IgG2b Fc competente en función de efector y una Fc IgG2b deficiente en función efectora mutada. Solo la proteína de fusión IL2-Fc que contiene el Fc competente en función del efector fue eficaz para prevenir el inicio de la enfermedad. Por lo tanto, estos investigadores enseñan que una proteína de fusión IL2-Fc con funciones efectoras puede eliminar las células T activadas que causan enfermedades, y que las funciones efectoras Fc son necesarias para su actividad terapéutica. Estas enseñanzas son bastante distintas de la presente tecnología inventiva, en donde un agonista selectivo de IL-2, que promueve el crecimiento y la actividad de las células Treg inmunosupresoras, se fusiona con un resto de proteína Fc deficiente en la función efectora para aumentar la exposición sistémica y optimizar la expansión Treg. Otro trabajo de Strom y colegas enseña el uso de una proteína de fusión IL2-Fc para promover la tolerancia al trasplante (Zheng, X, X., et al., 2003, Immunity, 19: 503-14). En este trabajo, se usa una proteína de fusión IL2-Fc en una "terapia triple" en donde se combina con un antagonista del receptor de IL15-Fc y rapamicina. Nuevamente, estos investigadores enseñan que la proteína de fusión IL2-Fc debe tener funciones efectoras Fc para ser eficaz, y además enseñan que esta proteína de fusión IL-2-Fc debe combinarse con otras dos moléculas para ser eficaz.

[0010] Esta invención proporciona un nuevo agente terapéutico, una proteína de fusión de agonista Fc IL2 selectivo, que combina la alta selectividad celular de un agonista IL2 selectivo para las células Treg con una vida media de circulación prolongada. En el curso del desarrollo de esta molécula, hubo hallazgos sorprendentes e inesperados que revelaron elementos estructurales y características de diseño de la proteína que son esenciales para la bioactividad, y que condujeron al descubrimiento de varias proteínas nuevas que cumplen con las características terapéuticas deseadas.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La invención proporciona una proteína de fusión, que comprende: una proteína variante humana N-terminal de IL-2 que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que comprende la sustitución C125S y una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L y Q126F; una proteína C-terminal IgG Fc; y un péptido conector de entre 5 y 20 residuos de aminoácidos colocados entre la proteína variante IL-2 y la proteína IgG Fc. La proteína de fusión se encuentra entre una proteína agonista selectiva $\alpha 2\gamma$ de IE2R (agonista selectivo IL2) y una proteína Fc de IgG. El resto agonista selectivo de IL2 proporciona una actividad terapéutica activando selectivamente la forma IE2R $\alpha\beta\gamma$ del receptor, estimulando selectivamente Tregs. El resto Fc proporciona una vida media circulante prolongada en comparación con la vida media circulante de IL-2 o una proteína agonista selectiva de IL2. El resto Fc aumenta la vida media circulante al aumentar el tamaño molecular de la proteína de fusión a más de 60.000 daltons, que es el límite aproximado para la filtración glomerular de macromoléculas por el riñón, y al reciclar la proteína de fusión a través de la proteína de receptor Fc neonatal (FcRn), el receptor que se une y recicla la IgG, prolongando así su vida media circulante. El resto Fc también será deficiente en funciones efectoras de Fc, como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), lo que permite que la proteína de fusión active Tregs selectivamente para potenciar la función Treg y expandir los números Treg. Los dos restos proteicos se fusionan de una manera que mantiene una bioactividad robusta del resto agonista selectivo de IL2 y permite que el resto Fc promueva una vida media circulante prolongada y, de este modo, potencie eficientemente la función y los números de Tregs. Esta potenciación de Tregs suprimirá respuestas autoinmunes o inflamatorias excesivamente exuberantes, y será beneficiosa en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Las proteínas de esta invención pueden ser dímeros formadores monoméricos o diméricos a través de residuos de cisteína en los restos o dominios Fc.

[0012] Más específicamente, esta invención proporciona una proteína de fusión, que comprende: un resto de proteína de variante de IL-2 humana N-terminal, y un resto de proteína IgG Fc C-terminal, en donde dicha proteína de fusión IL-2 tiene la capacidad de selectivamente activar el receptor de IL-2 de alta afinidad y activar selectivamente las células T reguladoras humanas. Las variantes de IL-2 incluyen aquellas con sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L y Q126F en relación con la proteína IL2 humana (SEQ ID NO: 1). Además, la proteína variante de IL-2 comprende IL-2 humana con la sustitución C125S. Las proteínas de esta invención están fusionadas en donde la proteína variante IL-2 y la proteína Fc IgG tienen un N-terminal y un C-terminal y dicha proteína variante IL-2 humana se fusiona en su C-terminal al N-terminal de la Proteína IgG Fc. El dominio variante de IL-2 y el dominio Fc se unen o fusionan a través de un péptido conector colocado entre la proteína variante de IL-2 y los restos de proteína Fc de IgG. El resto o dominio de la proteína IgG Fc será preferiblemente deficiente en funciones efectoras de Fc o contendrá una o más sustituciones de aminoácidos que reducen las funciones efectoras de la porción Fc de la proteína de fusión.

[0013] Un ejemplo de esta invención es una proteína, que comprende: una proteína variante de IL-2 que tiene sustituciones de aminoácidos N88R y C125S con respecto a IL-2 humana (SEC IID NO: 1), un péptido enlazador como se expone en SEQ ID NO: 15, y una proteína Fc de IgG1 humana como se establece en SEQ ID NO: 2, en donde

dicha proteína de fusión tiene la capacidad de activar selectivamente el receptor de IL-2 de alta afinidad y así activar selectivamente las células T reguladoras humanas. Las proteínas alternativas de esta invención incluyen: una proteína variante de IL-2 que tiene sustituciones de aminoácidos N88R y C125S con respecto a la IL-2 humana (SEQ ID NO: 1), un péptido conector como se establece en la SEQ ID NO: 15, y una proteína humana IgG2 Fc como se establece en SEQ ID NO: 3.

[0014] Una realización más específica de esta invención es una proteína dimérica, que comprende dos cadenas idénticas, donde cada cadena comprende un resto de proteína variante N-terminal de IL-2 y un resto de proteína IgG Fc C-terminal en donde: el resto de proteína variante IL-2 N-terminal humano tiene un extremo N y un extremo C varía del tipo silvestre de IL-2 humano como en la SEQ ID NO: 1 por al menos una de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L y Q126F, tienen al menos un 97% de identificación de secuencia para la secuencia ID No. 1; y tiene la capacidad de activar las células Treg uniéndose a un IL2R $\alpha\beta\gamma$ en esas células; la proteína variante IL-2 humana N-terminal se une en su C-terminal a un N-terminal de un conector de aminoácidos de entre 6 y 20 aminoácidos residuos donde dicho enlazador también tiene un C-terminal; y, el extremo C del enlazador de aminoácidos se une al extremo N del resto de la proteína IgG Fc que tiene un 97% de identificación de secuencia, p. ej., SEQ ID NO: 3 (IgG2) o SEQ ID No. 2 (IgG1N297A) y contiene residuos de cisteína; y donde las dos cadenas están unidas entre sí a través de los residuos de cisteína que forman los enlaces disulfuro entre cadenas del resto de la proteína IgG Fc. Los dímeros de esta invención se sustituyen adicionalmente en C125S del resto IL-2. Las proteínas de esta invención incluyen enlazadores de aminoácidos, que consisten preferiblemente en un grupo de residuos de glicina, residuos de serina y una mezcla de residuos de glicina y serina. Los enlazadores pueden comprender una mezcla de entre 12 y 17 residuos de serina y glicina, preferiblemente con una relación de residuos de glicina a residuos de serina en un intervalo de 3:1-5:1, p. ej., una relación de 4:1.

[0015] Esta invención proporciona además las composiciones anteriores en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0016] Esta invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican las proteínas descritas en este documento. Los ácidos nucleicos o preferiblemente unidos operativamente a casetes de expresión que pueden diseñarse para recombinarse con un genoma de la célula huésped o introducirse en un plásmido de replicación independiente o ácido nucleico extracromosómico.

[0017] Se describen además métodos de activar selectivamente las células T reguladoras humanos en un paciente en necesidad del mismo, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende las composiciones descritas administrarse en dosis terapéuticamente eficaces hasta concentraciones de células T reguladoras humanos alcanzan los niveles deseados.

[0018] Un método para medir el número de células Treg en una muestra de sangre humana poniendo en contacto células de la sangre humana con la proteína de fusión de la reivindicación 1 a una concentración de entre 1 nM y 0,01 nM, y luego la detección de células que se unen a la proteína mediante citometría de flujo también se proporciona.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

FIGURA 1 es una ilustración esquemática de la relación entre la vida media circulante, el nivel máximo de fármaco, la concentración biológica efectiva y la duración necesaria para estimular la proliferación de células Treg después de una dosis única de IL-2 o una proteína de fusión IL2-Fc con vida media aumentada. La línea discontinua representa el nivel sanguíneo a lo largo del tiempo de IL-2 después de una inyección subcutánea, y la línea continua representa el nivel sanguíneo a lo largo del tiempo de una proteína de fusión IL2-Fc. Las líneas punteadas horizontales indican las concentraciones (valores de CE50) necesarias para activar las células que expresan IL2R $\alpha\beta\gamma$ e IL2R $\beta\gamma$, respectivamente). La flecha de dos puntas indica la duración de la exposición (5-6 h) a IL-2 en la CE50 necesaria para estimular la proliferación celular.

FIGURA 2 muestra las configuraciones de diseño para las proteínas de fusión Fc. El compañero de fusión (X) puede fusionarse en el extremo N (X-Fc) o el extremo C (Fc-X) de la proteína Fc. Los péptidos enlazadores se pueden insertar entre X y Fc.

FIGURA 3 muestra una respuesta a la dosis de fosforilación de STAT5 estimulada por IL-2 y N88RL9AG1 en células T CD4+ medida por citometría de flujo. Las células se trataron con IL-2 o N88RFc a las concentraciones indicadas en la parte superior durante 10 minutos a 37°C, se fijaron, se permeabilizaron, se tiñeron con anticuerpos y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 3. Las células cerradas como CD4+ son se muestra, y las celdas se cerraron aún más con respecto a CD25 y pSTAT5 como se muestra en cada uno de los 4 cuadrantes. Los números en cada cuadrante indican el porcentaje de células CD4+ en cada puerta. Las células en los cuadrantes superiores representan el 1-2% más alto de las células que expresan CD25, una población enriquecida para las células Treg, y las células en los cuadrantes de la derecha son pSTAT5+. A. N88RL9AG1 estimula solo las células CD25 altas con alta

selectividad, mientras que IL-2 estimula masivamente las células CD25^{-bajas} y CD25^{altas} hasta concentraciones picomolares. B. D20H10G2 no tiene actividad estimulante de pSTAT5. No se observó activación de pSTAT5 en dos experimentos independientes. C. Control que muestra que D20H/IL2 estimula pSTAT5 en células CD25 altas mientras que D20H10G2 no. Los gráficos se muestran en el modo pseudocolor. Ambas proteínas se probaron a una concentración de 10⁻⁸ M.

FIGURA 4 muestra que las células T CD4+ tratadas con N88RL9AG1 exhibieron estimulación de los niveles de pSTAT5 en células que expresan altos niveles de FOXP3. Las células se trataron con 4 X 10⁻⁹ M IL-2 o N88RL9AG1 y luego se analizaron como se describe en el Ejemplo 3. La mayoría de las células pSTAT5+ tratadas con N88RL9AG1 también fueron FOXP3+, mientras que las células pSTAT5+ tratadas con IL-2 fueron FOXP3- y FOXP3+, siendo la mayoría FOXP3-.

FIGURA 5 muestra los rendimientos de proteínas de diferentes construcciones de fusión de Fc producidas en células HEK293. Las proteínas se expresaron en paralelo en un sistema de expresión transitoria optimizado y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se expresan como el rendimiento final de proteína purificada de cultivos de 30 ml. A. Los rendimientos proteicos de las proteínas de fusión N88R/IL2-Fc aumentan al aumentar la longitud del conector peptídico. B. Los rendimientos de las proteínas de fusión *wt* IL2-Fc solo se mejoran ligeramente con un conector peptídico de 15 residuos. Se obtuvieron mayores rendimientos de proteínas de fusión D20H/IL2-Fc en la configuración X-Fc en lugar de la configuración Fc-X.

FIGURA 6 muestra la dependencia de la bioactividad de IL-2 de la longitud del conector peptídico en las proteínas de fusión N88R/IL2-Fc. (A) Las señales de pSTAT5 en células T CD25^{altas} CD4+ (Tregs) aumentan al aumentar la longitud del conector peptídico. (B) No se observó señal significativa de pSTAT5 con ninguna de las proteínas N88R/IL2-Fc en células CD25^{-bajas}. La señal pSTAT5 del control interno 10⁻⁸ M IL-2 se indica en ambos paneles mediante el triángulo negro.

FIGURA 7 muestra la bioactividad de las proteínas de fusión D20H/IL2-Fc en Tregs humanos. La potencia de D20H15AG1 es sustancialmente menor que la de N88RL15AG1, y D20H15AG1 (configuración X-Fc) y AG1L15D20H (configuración Fc-X) tienen potencias similares. Las 3 proteínas tienen un conector peptídico de 15 residuos.

FIGURA 8 muestra la bioactividad de la actividad *wt* IL-2-Fc pSTAT5 con y sin un conector peptídico de 15 residuos. La bioactividad de IL-2 solo se mejora modestamente mediante un conector peptídico de 15 residuos tanto en Tregs (A) como en células CD25^{-bajas} (B).

FIGURA 9. Selectividad de proteínas agonistas selectivas de IL-2 e IL-2 en 7 tipos diferentes de células inmunes en PBMC humanas. N88RL15AG1 es altamente selectivo para Tregs en comparación con *wt* IL-2 y WTL15AG1, y muestra una mayor selectividad en múltiples tipos de células que N88R/IL2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Introducción

[0020] Esta invención es una nueva proteína terapéutica de fusión que comprende tres elementos principales de proteínas: (1) una citocina IL-2 modificada que ha sido modificada para ser altamente selectiva para las células Treg, (2) una proteína Fc deficiente en función efectora que aumentará la vida media circulante de la proteína, y (3) un péptido conector entre los dos restos que es necesario para una alta actividad biológica de la proteína de fusión. Las proteínas de fusión que constituyen esta invención se descubrieron a través de hallazgos iniciales no anticipados que iban en contra de las enseñanzas en la técnica anterior de las proteínas de fusión IL-2, y la investigación que condujo a estas moléculas ha definido relaciones clave de estructura-actividad importantes para su actividad biológica y terapéutica. Las moléculas definidas por esta invención permitirán el tratamiento seguro y efectivo de enfermedades autoinmunes mediante el nuevo mecanismo de estimular la producción de una pequeña subpoblación de células T que suprimen la patología autoinmune e inflamatoria. Este terapéutico que rompe paradigmas puede potencialmente tratar varias enfermedades autoinmunes diferentes.

Definiciones

[0021] "Al menos un porcentaje (p. ej., 97%) de secuencia se identifica con la secuencia ID N° 1", como se usa en el presente documento, se refiere al grado en que la secuencia de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos es la misma. El porcentaje de identidad entre una secuencia de interés y una segunda secuencia sobre una ventana de evaluación, p. ej., a lo largo de la secuencia de interés, puede calcularse alineando las secuencias, determinando el número de residuos (nucleótidos o aminoácidos) dentro de la ventana de evaluación opuesta a un residuo idéntico que permite la introducción de brechas para maximizar la identidad, dividiendo por el número total de residuos de la secuencia de interés o la segunda secuencia (la que sea mayor) que se encuentran dentro de la ventana, y multiplicándola por 100. Cuando se calcula el número de residuos idénticos necesarios para lograr un porcentaje de identidad particular, las

fracciones se deben redondear al número entero más cercano. El porcentaje de identidad se puede calcular con el uso de una variedad de programas de computadora. Por ejemplo, los programas informáticos como BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, etc., generan alineamientos y proporcionan un porcentaje de identidad entre las secuencias de interés. El algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 22264-22268, 1990) modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5877, 1993 se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (Altschul, y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Para obtener alineaciones separadas para propósitos de comparación, Gapped BLAST se utiliza como se describe en Altschul et al. (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas. Se puede usar una matriz PAM250 o BLOSUM62. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Consulte el sitio web que tiene la dirección URL mundial de "ncbi.nlm.nih.gov" para estos programas. En una realización específica, el porcentaje de identidad se calcula utilizando BLAST2 con los parámetros predeterminados proporcionados por el NCBI.

[0022] "N-terminal" se refiere al extremo de un péptido o polipéptido que lleva un grupo amino en contraste con el extremo carboxilo que lleva un grupo ácido carboxílico.

[0023] "C-terminal" se refiere al extremo de un péptido o polipéptido que lleva un grupo de ácido carboxílico en contraste con el amino terminal que lleva un grupo amino.

[0024] El "resto de proteína Fc IgG C-terminal" se refiere a una porción de una proteína de fusión que deriva de dos fragmentos de proteína idénticos, cada uno con una región bisagra, un segundo dominio constante y un tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas de molécula de IgG, y que consisten en las cadenas pesadas carboxi-terminales disulfuro unidas entre sí a través de la región de la bisagra. Se define funcionalmente como aquella parte de la molécula de IgG que interactúa con la proteína del complemento C1q y los receptores de IgG-Fc (FcγR), mediando las funciones efectoras de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La secuencia puede modificarse para disminuir las funciones efectoras, aumentar la vida media circulante y eliminar los sitios de glicosilación.

Variantes IL2

[0025] Proteínas variantes de IL2 de esta invención son agonistas selectivos IL-2αβγ. Funcionalmente activan selectivamente el complejo receptor IL2Rαβγ en relación con el complejo receptor IL2R ββ. Se deriva de una proteína IL-2 de tipo silvestre definida estructuralmente por tener al menos una identidad de secuencia del 95% con la IL-2 de tipo silvestre de la ID de secuencia N° 1 y funcionalmente definida por la capacidad de activar preferentemente las células Treg. La proteína también se puede definir funcionalmente por su capacidad para activar selectivamente la señalización del receptor de IL-2 en Tregs, según lo medido por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células Treg en comparación con las células T CD4+CD25-/bajas o células NK, o por la activación selectiva de células T estimuladas con fitohemaglutinina versus células NK.

[0026] El "resto de proteína variante de IL-2 humana N-terminal" se refiere a un dominio N-terminal de una proteína de fusión que se deriva de una proteína IL-2 de tipo silvestre que se define estructural y funcionalmente anteriormente.

[0027] "C-terminal" se refiere al extremo de un péptido o polipéptido que lleva un grupo de ácido carboxílico en contraste con el amino terminal que lleva un grupo amino.

Tregs

[0028] "Tregs" o "células Treg" se refieren a células T reguladoras. Las células T reguladoras son una clase de células T que suprimen la actividad de otras células inmunes, y se definen mediante citometría de flujo por el fenotipo marcador de células CD4+CD25+FOXP3+. Debido a que FOXP3 es una proteína intracelular y requiere fijación celular y permeabilización para la tinción, el fenotipo de superficie celular CD4+CD25+CD127- puede usarse para definir Tregs vivos. Las Tregs también incluyen varias subclases de Treg, como tTregs (derivadas del timo) y pTregs (derivadas periféricamente, diferenciadas de las células T ingenuas en la periferia). Todas las Tregs expresan el receptor IL2Rαβγ, no producen su propia IL-2 y son dependientes de IL-2 para el crecimiento, y alguien experto en la técnica reconocerá que ambas clases serán activados selectivamente por un agonista selectivo IL2Rαβγ.

Péptidos enlazadores

[0029] "Enlazador peptídico" se define como una secuencia de aminoácidos ubicada entre las dos proteínas que comprende una proteína de fusión, de modo que la secuencia peptídica enlazadora no se deriva de ninguna proteína asociada. Los enlazadores peptídicos se incorporan a las proteínas de fusión como espaciadores para promover el plegamiento apropiado de la proteína y la estabilidad de los restos proteicos componentes, mejorar la expresión de la proteína o permitir una mejor bioactividad de los dos socios de fusión (Chen, et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357-69). Los enlazadores de péptidos se pueden dividir en las categorías de péptidos flexibles no estructurados o péptidos estructurados rígidos.

Proteínas de fusión Fc

5 [0030] Una "proteína de fusión Fc" es una proteína producida por tecnología de ADN recombinante en donde la lectura de la traducción del marco del dominio Fc de una proteína IgG de mamífero está fusionado a la de otra proteína ("pareja de fusión de Fc") para producir un nuevo polipéptido recombinante único. Las proteínas de fusión Fc se producen típicamente como dímeros unidos por disulfuro, unidos por enlaces disulfuro ubicados en la región bisagra.

Activación funcional

10 [0031] "Bioactividad" se refiere a la medición de la actividad biológica en un ensayo *in vitro* cuantitativo basado en células.

15 [0032] La "activación funcional de las células Treg" se define como una respuesta mediada por IL-2 en Tregs. Las lecturas del ensayo para la activación funcional de las células Treg incluyen la estimulación de pSTAT5, la proliferación de células Treg y la estimulación de los niveles de proteínas efectoras Treg.

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN

20 [0033] Hay varias opciones para el diseño y la construcción de una proteína de fusión Fc, y las opciones entre estas opciones de diseño se presentan a continuación para permitir la generación de una molécula con la actividad biológica deseada y características farmacéuticas. Las opciones de diseño clave son: (1) la naturaleza del agonista selectivo de IL2, (2) la elección de la fracción proteica Fc, (3) la configuración de socios de fusión en la proteína de fusión, y (4) la secuencia de aminoácidos en la unión entre el Fc y la proteína de compañero de fusión.

Métodos Generales

25 [0034] En general, la preparación de las proteínas de fusión de la invención puede realizarse por procedimientos descritos en la presente memoria y por técnicas de ADN recombinante reconocidas que implican, p. ej., reacciones en cadena de la polimerasa de amplificación (PCR), preparación de ADN plasmídico, escisión de ADN con enzimas de restricción, preparación de oligonucleótidos, ligadura de ADN, aislamiento de ARNm, introducción del ADN en una célula adecuada, transformación o transfección de un huésped, cultivo del huésped. Además, las moléculas de fusión pueden aislarse y purificarse usando agentes caotrópicos y métodos electroforéticos, de centrifugación y cromatográficos bien conocidos. Ver generalmente, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. (1989); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1989) para conocer la divulgación relacionada con estos métodos.

30 [0035] Los genes que codifican las proteínas de fusión de esta invención implican la digestión con enzimas de restricción y ligación como los pasos básicos empleados para producir ADN que codifica las fusiones deseadas. Los extremos del fragmento de ADN pueden requerir modificación antes de la ligadura, y esto puede lograrse rellenando salientes, eliminando porciones terminales de los fragmentos con nucleasas (p. ej., ExoIII), mutagénesis dirigida al sitio, o agregando nuevos pares de bases por PCR. Se pueden emplear polienlazadores y adaptadores para facilitar la unión de fragmentos seleccionados. La construcción se ensambla típicamente en etapas que emplean rondas de restricción, ligadura y transformación de *E. coli*. Numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción de la construcción de expresión son conocidos en la técnica (λ .ZAP y pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, LaJolla, California, pET, Novagen Inc., Madison, Wis.-- citado en Ausubel et al., 1999) y la elección particular no es crítica para la invención. La selección del vector de clonación estará influenciada por el sistema de transferencia de genes seleccionado para la introducción del constructo de expresión en la célula huésped. Al final de cada etapa, la construcción resultante puede analizarse mediante restricción, secuencia de ADN, hibridación y análisis por PCR.

35 [0036] La mutagénesis dirigida al sitio se usa típicamente para introducir mutaciones específicas en los genes que codifican las proteínas de fusión de esta invención mediante métodos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2004/0171154; Storici et al., 2001, *Nature Biotechnology* 19: 773-776; Kren y col., 1998, *Nat. Medicine*. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett* 43: 15-16. Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio puede usarse en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que pueden usarse para preparar las variantes de esta invención.

40 [0037] Varios promotores (región reguladora de iniciación transcripcional) se pueden usar de acuerdo con la invención. La selección del promotor apropiado depende del huésped de expresión propuesto. Se pueden usar promotores de fuentes heterólogas siempre que sean funcionales en el huésped elegido.

45 [0038] Se pueden usar varias secuencias de señal para facilitar la expresión de las proteínas descritas en el presente documento. Las secuencias de señal se seleccionan o diseñan para una secreción eficiente y también se puede usar el procesamiento en el huésped de expresión. Una secuencia de señal que es homóloga a la secuencia de codificación de TCR o la secuencia de codificación de IL-2 de ratón puede usarse para células de mamífero. Otra secuencia señal adecuada/pares de células hospedadoras incluyen la secuencia de señal *B. subtilis* sacB para la secreción en *B.*

subtilis, y el factor de emparejamiento α *Saccharomyces cerevisiae* o secuencias de ácido señal de la fosfatasa pho1 *P. pastoris* para la secreción de *P. pastoris*. La secuencia de señal se puede unir directamente a través de la secuencia que codifica el sitio de escisión de la peptidasa de señal a la secuencia de codificación de proteína, o a través de un puente de nucleótidos corto.

5
 [0039] Los elementos para mejorar la transcripción y la traducción se han identificado para la expresión de sistemas de proteínas eucariotas. Por ejemplo, colocar el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 1000 pb a cada lado de un promotor heterólogo puede elevar los niveles de transcripción de 10 a 400 veces en las células vegetales. La construcción de expresión también debe incluir las secuencias de iniciación traduccional apropiadas. La modificación del constructo de expresión para incluir una secuencia consenso de Kozak para un inicio traduccional adecuado puede aumentar el nivel de traducción en 10 veces.

15
 [0040] Los casetes de expresión se unen a vectores apropiados compatibles con el huésped que se está empleando. El vector debe ser capaz de acomodar la secuencia de ADN que codifica las proteínas de fusión a expresar. Las células huésped adecuadas incluyen células eucariotas y procariotas, preferiblemente aquellas células que pueden transformarse fácilmente y exhiben un rápido crecimiento en medio de cultivo. Las células huésped específicamente preferidas incluyen procariotas como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas como células animales y cepas de levadura, p. ej., *S. cerevisiae*. Generalmente se prefieren las células de mamífero, particularmente HEK, J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros hospedadores adecuados incluyen, p. ej., células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Ver Sambrook, supra. Se pueden seleccionar líneas celulares transformadas o transfectadas estables. Los sistemas de transcripción-traducción *in vitro* también pueden emplearse como un sistema de expresión.

25
 [0041] El ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada puede introducirse en una célula huésped mediante técnicas estándar para transfectar células. El término "transfectar" o "transfección" pretende abarcar todas las técnicas convencionales para introducir ácido nucleico en las células huésped, incluida la coprecipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección, transducción viral y/o integración. Se pueden encontrar métodos adecuados para transfectar células huésped en Sambrook et al. supra y otros libros de texto de laboratorio.

30
 [0042] Alternativamente, se puede utilizar construcción de genes sintéticos para la totalidad o parte de la construcción de las proteínas descritas en el presente documento. Esto implica la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar una molécula de polipéptido de interés. La síntesis génica se puede realizar utilizando una serie de técnicas, como la tecnología basada en microchips multiplex descrita por Tian, et. al., (Tian, et. al., Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluídicos foto-programables.

40
 [0043] Las proteínas de fusión de esta invención se aíslan a partir de células hospedadoras cosechadas o del medio de cultivo. Las técnicas estándar de purificación de proteínas se utilizan para aislar las proteínas de interés del medio o de las células cosechadas. En particular, las técnicas de purificación pueden usarse para expresar y purificar una proteína de fusión deseada a gran escala (es decir, en cantidades de al menos miligramos) a partir de una variedad de enfoques que incluyen botellas giratorias, matraces giratorios, placas de cultivo de tejidos, biorreactor o un fermentador

45 EL RESTO DEL AGONISTA SELECTIVO DE IL2

[0044] La IL-2 con la sustitución N88R es un caso ejemplar de un agonista selectivo de IL2 para el receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Shanafelt, AB, et al., 2000, Nat Biotechnol, 18: 1197-202). IL2/N88R es deficiente en la unión a la subunidad del receptor IL2R β y al complejo del receptor IL2R $\beta\gamma$, pero puede unirse al complejo del receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$ y estimular la proliferación de células T activadas por PHA que expresan IL2R $\alpha\beta\gamma$ tan eficazmente como la *wt* IL-2, mientras que exhiben un 3000 veces reducido la capacidad de estimular la proliferación de IL2R $\beta\gamma$ células NK que expresan, otros agonistas IL2R $\alpha\beta\gamma$ selectivos con perfiles de actividad similares incluyen IL2 con las sustituciones N88i, N88G, y D20H, y otras variantes IL2 con las sustituciones Q126L y Q126F (residuos de contacto con la subunidad IL2RG) también poseen actividad agonista selectiva de IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Cassell, DJ, et al., 2002, Curr Pharm Des., 8: 2171-83). Un profesional experto en la técnica reconocería que cualquiera de estas moléculas de agonista selectivo de IL2 puede ser sustituida por el resto IL2/N88R con la expectativa de que una proteína de fusión Fc tendrá una actividad similar. Todas las mutaciones mencionadas anteriormente pueden realizarse en el fondo de *wt* IL-2, o *wt* IL-2 con la sustitución C125S, que es una sustitución que promueve la estabilidad de IL-2 eliminando un residuo de cisteína desapareado. Esta invención también se puede usar con otras mutaciones o truncamientos que mejoran la producción o la estabilidad sin afectar significativamente la actividad activadora del receptor de IL-2.

60
 [0045] Las variantes de esta invención incluyen opcionalmente variantes sustituidas de forma conservadora que se aplican tanto a aminoácido como secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados

se pueden lograr mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base y/o desoxiinosina mixtos (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido de alanina. Por lo tanto, en cada posición en donde un codón especifica una alanina, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son variaciones silenciosas, que son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

[0046] Con respecto a la sustitución conservadora de secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que individuales sustituciones, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño El porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una variante conservadoramente modificada donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes conservativamente modificadas son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

[0047] Los siguientes grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) alanina (A), glicina (G);
- 2) serina (S), treonina (T);
- 3) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 4) asparagina (N), glutamina (Q);
- 5) cisteína (C), metionina (M);
- 6) arginina (R), lisina (K), histidina (H);
- 7) isoleucina (I), leucina (L), valina (V); y
- 8) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

RESTO DE PROTEÍNA Fc

[0048] Una opción de diseño clave es la naturaleza del resto de proteína Fc. Las principales aplicaciones terapéuticas de las proteínas de fusión Fc son (1) dotar a la proteína compañera de fusión de funciones efectoras de inmunoglobulina Fc; o (2) aumentar la vida media circulante de la proteína de la pareja de fusión (Czajkowsky, et al., 2012, EMBO Mol Med. 4: 1015-28). Las funciones efectoras primarias de las proteínas IgG son la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), funciones mediadas por la unión de Fc para complementar la proteína C1q y los receptores de IgG-Fc (FcγR), respectivamente. Estas funciones efectoras son importantes cuando la proteína terapéutica se usa para dirigir o mejorar la respuesta inmune a un blanco o célula de antígeno particular. La proteína de fusión de esta invención está diseñada únicamente para aumentar la vida media circulante del resto agonista selectivo de IL2, y las funciones efectoras no son necesarias e incluso pueden ser tóxicas, y por lo tanto expresamente no deseadas. Por ejemplo, una proteína de fusión agonista-Fc de IL2 selectiva con una función efectora Fc competente puede potencialmente matar las células Treg que la proteína de fusión de esta invención está buscando activar y expandir, exactamente lo contrario del objetivo terapéutico para las enfermedades autoinmunes. Hay cuatro subclases de IgG humana que difieren en las funciones efectoras (CDC, ADCC), vida media circulante y estabilidad (Salfeld, JG, 2007, Nature Biotechnology 25: 1369 -72). IgG1 posee funciones efectoras de Fc, es la subclase de IgG más abundante y es la subclase más utilizada en las proteínas terapéuticas aprobadas por la FDA de los EE.UU. IgG2 es deficiente en las funciones efectoras de Fc, pero está sujeto a dimerización con otras moléculas de IgG2, y también está sujeto a la inestabilidad debido a la codificación de enlaces disulfuro en la región bisagra. IgG3 posee funciones efectoras Fc y tiene una región de bisagra rígida extremadamente larga. La IgG4 es deficiente en las funciones efectoras de Fc, tiene una vida media en circulación más corta que las otras subclases, y el dímero de IgG4 es bioquímicamente inestable debido a que solo un enlace disulfuro en la región de la bisagra conduce al intercambio de cadenas H entre diferentes moléculas de IgG4. Un experto en la técnica reconocería que los restos de proteína Fc de IgG2 e IgG4 no poseen funciones efectoras y pueden usarse en esta invención. El experto en la materia también reconocería que las modificaciones de la secuencia de Fc se han descrito en la técnica de tal manera que la región bisagra de IgG2 Fc se puede modificar para evitar la agregación, o que la

región bisagra de IgG4 Fc se puede modificar para estabilizar dímeros. Alternativamente, se han generado variantes deficientes en la función efectora de IgG1. Una de esas variantes tiene una sustitución de aminoácidos en la posición N297, la ubicación de un sitio de glicosilación unido a N. La sustitución de este residuo de asparagina elimina el sitio de glicosilación y reduce significativamente la actividad de ADCC y CDC (Tao, MH, et al., 1989, J Immunol. 143: 2595-2601). Esta variante se usa como un ejemplo de caso en la presente invención. Otra variante deficiente de la función efectora de IgG1 es IgG1 (L234FAL235E/P331S) (Oganesyan, et al., 2008, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64: 700-4), que muta aminoácidos en los sitios de unión de C1q y FcγR, y Un experto en la materia consideraría usar estas variantes de Fc similares o similares para generar proteínas de fusión IL2SA-Fc eficientes y estables. Un artesano experto también reconocería que las formas de restos de proteína Fc diseñados para ser monómeros estables en lugar de dímeros (Dumont, JA, et al., 2006, BioDrugs 20: 151-60; Liu Z, et al., J Biol Chem, 2015 20; 290: 7535-62) también se pueden combinar con el agonista selectivo de IL-2 de esta invención. Además, un experto en la técnica reconocería que un heterodímero funcionalmente monomérico compuesto por un polipéptido de la cadena H de IL-2-Fc combinado con un polipéptido de la cadena H de Fc y ensamblado utilizando tecnología de anticuerpos biespecíficos (Zhu Z, et al., 1997 Protein Sci. 6: 781-8) también se puede combinar con el agonista selectivo de IL-2 de esta invención. Algunas proteínas de fusión IL-2 Fc se han hecho con moléculas de anticuerpos IgG intactas, ya sea con (Penichet, ML, et al., 1997, Hum Antibodies. 8: 106-18) o sin (Bell, et al., 2015, J Autoimmun. 56: 66-80) especificidad de antígeno en el resto IgG. Además, un experto en la técnica reconocerá que las variantes de Fc que carecen de parte o la totalidad de la región de bisagra se pueden usar con esta invención.

[0049] Las proteínas de fusión Fc se pueden hacer en dos configuraciones, indicadas aquí como X-Fc y Fc-X, donde X, la proteína asociada de fusión, está en el extremo N y Fc está en el extremo C, y Fc- X, donde el Fc está en el extremo N, y la proteína de la pareja de fusión está en el extremo C (FIGURA 2). Hay ejemplos en la literatura que muestran que diferentes pares de fusión pueden tener preferencias distintas para las fusiones Fc N o C-terminales. Por ejemplo, se ha demostrado que FGF21 tiene una fuerte preferencia por la configuración Fc-X. Fc-FGF21 tiene una bioactividad activadora del receptor esencialmente igual a la del propio FGF21, mientras que FGF21-Fc tiene una bioactividad reducida en 1000 veces (Hecht, et al., 2012, PLoS One. 7 (11): e49345). Se ha hecho una serie de proteínas de fusión IL-2 Fc para diversas aplicaciones, y se ha informado que tienen una buena bioactividad de IL-2 cuando se fusionan directamente a Fc tanto en Fc-X (Gillies, et al., 1992, Proc Natl Acad Sci, 89: 1428-32; Bell, et al., 2015, J Autoimmun. 56: 66-80) y configuraciones X-Fc (Zheng, XX, et al., 1999, J Immunol. 163: 4041-8). Gavin y col. (US 20140286898 A1) describe las proteínas de fusión Fc que contienen IL-2 y ciertas variantes de IL-2 en la configuración Fc-X que tienen una bioactividad similar a la de la citocina IL-2 libre, pero en contraste con los resultados de Zheng et al. (Zheng, XX, et al., 1999, J Immunol. 1999, 163: 4041-8) encontraron que las proteínas de fusión variantes de IL-2 en la configuración X-Fc tienen bioactividad reducida o nula. Por lo tanto, Gavin, y col. generalmente enseña lejos de las proteínas de fusión IL-2 Fc N-terminales. Otro factor que influye en la elección de la configuración de la proteína de fusión es el impacto en la vida media circulante. Un hallazgo recurrente en la literatura es que las proteínas de fusión IL-2 en la configuración Fc-X tienen semividas relativamente bajas, mucho menos que la semivida de 21 días de la IgG1 humana en humanos o la semivida de la FDA actual proteínas de fusión Fc aprobadas (TABLA I). Se ha informado que las proteínas de fusión IgG-IL2 en la configuración Fc-X tienen semividas circulantes relativamente cortas del orden de horas en ratones (Gillies SD, 2002 Clin Cancer Res., 8: 210-6; Gillies, SD, US 2007/0036752 A2; Bell CJ, 2015 J Autoimmun. 56: 66-80) y del orden de 3,3 horas (Ribas A., J 2009 Transl Med. 7:68) y 3,7 horas (King DM, 2004 J Clin Oncol., 22: 4463-73) en humanos, y se ha informado que las proteínas de fusión Fc-IL2 tienen semividas circulantes de 12,5 horas en ratones (Zhu EF, Cancer Cell. 2015, 13; 27 (4): 489-501). La proteólisis entre el extremo C-terminal del resto Fc y el resto IL-2 contribuye a las semividas circulantes cortas (Gillies SD, 2002 Clin Cancer Res., 8: 210-6; Zhu EF, 2015 Cancer Cell. 27: 489 -501). Debido a estas vidas medias relativamente cortas, nos hemos centrado en las proteínas de fusión Fc de Agonista Selectivo IL2 en la configuración X-Fc.

ENLAZADOR

[0050] La secuencia de aminoácidos en la unión entre el Fc y la proteína de par de fusión puede ser (1) una fusión directa de las dos secuencias de la proteína o (2) una fusión con un péptido enlazador que interviene. De las 10 proteínas de fusión Fc que actualmente están aprobadas por la FDA de los EE.UU. para uso clínico (TABLA I), 8 son fusiones directas de la proteína asociada a la fusión con Fc, mientras que 2 poseen péptidos enlazadores, por lo que muchas proteínas de fusión Fc pueden ser funcionales sin péptidos de enlazador. Los péptidos enlazadores se incluyen como espaciadores entre los dos restos proteicos. Los péptidos enlazadores pueden promover el plegamiento adecuado de proteínas y la estabilidad de los restos proteicos componentes, mejorar la expresión de proteínas y permitir una mejor bioactividad de los restos proteicos componentes (Chen, et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357-69). Los enlazadores peptídicos utilizados en muchas proteínas de fusión están diseñados para ser péptidos flexibles no estructurados. Un estudio de la longitud, secuencia y conformación de péptidos enlazadores entre dominios estructurales independientes en proteínas naturales ha proporcionado una base teórica para el diseño de enlazadores peptídicos flexibles (Argos, 1990, J Mol Biol. 211: 943-58). Argos proporcionó la guía de que los péptidos enlazadores flexibles largos se compongan de pequeños residuos no polares como la glicina y pequeños residuos polares como la serina y la treonina, con múltiples residuos de glicina que permitan una conformación altamente flexible y la serina o la treonina que proporcionan un área de superficie polar para limitar la interacción hidrofóbica dentro del péptido o con los restos de proteína de fusión de componente. Muchos enlaces peptídicos descritos en la literatura son ricos en glicina y serina, como las repeticiones de la secuencia GGGGS, aunque un experto en la materia reconocerá que otras

secuencias siguen las recomendaciones generales de Argos (Argos, 1990, J Mol Biol. 20; 211 (4): 943-58) también se puede utilizar. Por ejemplo, una de las proteínas descritas en este documento contiene un péptido conector compuesto de glicina y alanina (SEQ ID NO 15). Un péptido conector flexible con una conformación de cadena beta completamente extendida tendrá una longitud de extremo a extremo de aproximadamente 3,5 Å por residuo. Por lo tanto, un péptido conector de 5, 10, 15 o 20 residuos tendrá una longitud máxima completamente extendida de 17,5 Å, 35 Å, 52,5 Å o 70 Å, respectivamente. La longitud máxima de extremo a extremo del conector peptídico también puede ser una guía para definir las características de un conector peptídico en esta invención. El objetivo de un péptido conector dentro de la presente invención es permitir el logro de una conformación y orientación apropiadas de los restos de proteínas de fusión individuales para permitir el acoplamiento del resto agonista selectivo de IL-2 con su receptor afín y permitir la unión del resto Fc al FcRn para permitir el reciclaje de proteínas de fusión y una vida media en circulación prolongada. Dado que los factores que influyen en estas interacciones son difíciles de predecir, el requisito y la longitud adecuada de un péptido conector deben ser probados y determinados empíricamente. Muchas proteínas de fusión Fc no requieren péptidos enlazadores, como lo demuestran las 8 de cada 10 proteínas de fusión Fc aprobadas por la FDA de EE.UU. que carecen de los péptidos enumerados en la Tabla I. En contraste, Dulaglutida, una fusión de GLP-1 y Fc, contiene un conector de péptido de 15 residuos que tiene una fuerte influencia en la bioactividad (Glaesner, patente de los Estados Unidos 7,452,966 B2). El trabajo previo en la técnica sobre las proteínas de fusión IL-2-Fc indica que los péptidos enlazadores no son necesarios para la bioactividad. Se ha informado que las proteínas de fusión de IL-2 que contienen IL-2 o IL-2 wt con la sustitución C125S en la orientación Fc-X tienen una bioactividad de IL-2 similar a la de la citocina IL-2 libre sin (Gillies, et al., 1992, Proc Natl Acad Sci, 89: 1428-32; Gavin, y col., Solicitud de Patente de EE.UU. 20140286898 A1) o con (Bell, et al., 2015, J Autoimmun. 56: 66-80) conectores de péptidos. En la orientación X-Fc, Zheng et al. informó la bioactividad de IL-2 de una proteína de fusión de IL-2 en la configuración X-Fc que era esencialmente indistinguible de la de la propia IL-2 (Zheng, XX, et al., 1999, J Immunol. 1999, 163: 4041-8) Esta extensa técnica anterior enseña que la fusión de una proteína IL-2 con Fc no requerirá un péptido conector para tener una alta bioactividad de IL-2. Sin embargo, Gavin et al. informó que las proteínas de fusión de Fc en la configuración X-Fc que contienen ciertas variantes de IL-2 con selectividad de receptor alterada tienen una bioactividad reducida o nula sin un conector peptídico o con un conector peptídico de 5 residuos (Gavin, y col., Solicitud de Patente de EE.UU. 20140286898 A1).

BIOENSAYOS

[0051] Bioensayos robustos y cuantitativos son necesarios para la caracterización de la actividad biológica de proteínas candidatas. Estos ensayos deben medir la activación del receptor de IL2, medir las consecuencias funcionales posteriores de la activación en Tregs y medir los resultados y funciones terapéuticamente relevantes de los Tregs activados. Estos ensayos se pueden usar para medir la actividad terapéutica y la potencia de las moléculas de agonista selectivo de IL2, y también se pueden usar para medir la farmacodinámica de un agonista selectivo de IL2 en animales o en humanos. Un ensayo mide la fosforilación de la proteína de transducción de señal STAT5, citometría de flujo medida con un anticuerpo específico para la proteína fosforilada (pSTAT5). La fosforilación de STAT5 es un paso esencial en la vía de transducción de señales de IL-2. STAT5 es esencial para el desarrollo de Treg, y una forma activada constitutivamente de STAT5 expresada en células CD4+CD25+ es suficiente para la producción de células Treg en ausencia de IL-2 (Mahmud, SA, et al., 2013, JAKSTAT 2: e23154) Por lo tanto, un experto en la técnica reconocerá que la medición de STAT5 fosforilada (pSTAT5) en células Treg es un reflejo de la activación de IL-2 en estas células y será predictiva de otros resultados biológicos del tratamiento con IL-2 dado el tiempo de exposición adecuado y condiciones. Otro ensayo para la activación funcional mide la proliferación estimulada por IL-2 de células Treg. Alguien experto en la materia reconocerá que la proliferación de Treg se puede medir mediante la incorporación de timidina tritiada en células Treg purificadas, mediante un aumento en el número de células Treg en una población mixta de células medidas por citometría de flujo y las frecuencias de CD4+CD25+FOXP3+ o la CD4+CD25+CD127- fenotipos marcadores, mediante el aumento de la expresión en las células Treg de proteínas del ciclo celular asociadas a la proliferación, como Ki-67, o mediante la medición de la dilución asociada a la división celular de un colorante fluorescente vital como el éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) por citometría de flujo en células Treg. Otro ensayo para la activación funcional de Tregs con IL-2 es el aumento de la estabilidad de Tregs. Algunos piensan que las células pTreg son inestables y tienen el potencial de diferenciarse en células T efectoras Th1 y Th17. La activación de IL-2 de Tregs puede estabilizar Tregs y prevenir esta diferenciación (Chen, Q., et al., 2011, J Immunol. 186: 6329-37). Otro resultado de la estimulación IL-2 de Tregs es la estimulación del nivel de moléculas efectoras funcionales Treg, como CTLA4, GITR, LAG3, TIGIT, IL-10, CD39 y CD73, que contribuyen a la actividad inmunosupresora de Tregs.

[0052] Para desarrollar una proteína IL2 agonista selectiva de Fc, que inicialmente se centró en proteínas en la configuración X-Fc debido a la corta vida media que han sido reportados para las proteínas de fusión IL2 en la configuración Fc-X circulante. Las dos primeras proteínas producidas y probadas, una con y otra sin un péptido conector, mostraron inesperadamente que la proteína con el conector péptido tenía bioactividad IL-2 y que la proteína sin el conector péptido no tenía bioactividad detectable. Ambas proteínas exhibieron una alta afinidad de unión por IL2RA, lo que indica que ambas proteínas se plegaron adecuadamente. Estos resultados sugirieron que era necesario un péptido conector para la activación y bioactividad del receptor de IL-2. Luego se produjo una serie de análogos adicionales para eliminar otras variables y probar esta hipótesis. Los resultados de estos estudios condujeron al descubrimiento de relaciones clave de estructura-actividad para esta proteína terapéutica y crearon nuevas moléculas con la actividad deseada y los atributos farmacéuticos

FORMULACIÓN

5 **[0053]** Las composiciones farmacéuticas de las proteínas de fusión de la presente invención se definen como formuladas para la administración parenteral (particularmente intravenosa o subcutánea) de acuerdo con métodos convencionales. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán proteínas de fusión de la presente invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para evitar la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. 10 Los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19.sup.th.ed, 1995.

15 **[0054]** Como ilustración, las formulaciones farmacéuticas pueden suministrarse como un kit que comprende un recipiente que comprende proteínas de fusión de la presente invención. Las proteínas terapéuticas se pueden proporcionar en forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples, como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección, o como una jeringa precargada. Dicho kit puede comprender además información escrita sobre indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir una declaración de que las proteínas de fusión de la presente invención están contraindicadas en pacientes con hipersensibilidad conocida a las proteínas de fusión de la presente invención.

20 **[0055]** Las proteínas de fusión de agonista selectivo IL-2 de esta invención se pueden incorporar en composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones incluyen típicamente la proteína y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos suplementarios (p. ej., antibióticos) también se pueden incorporar a las composiciones.

30 **[0056]** La composición farmacéutica A se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Es probable que las proteínas de fusión del agonista selectivo de IL-2 de la invención se administren a través de una ruta parenteral. Los ejemplos de vías de administración parenteral incluyen, p. ej., intravenosa, intradérmica y subcutánea. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como fosfato sódico, ácido clorhídrico o hidróxido sódico (p. ej., a un pH de aproximadamente 7,2-7,8, p. ej., 7,5). La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

40 **[0057]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, p. ej., agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. El mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión puede facilitarse mediante el uso de tensioactivos, p. ej., polisorbato o Tween. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, p. ej., parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, p. ej., azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición.

55 **[0058]** Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

65 **[0059]** En una realización, la proteína de fusión agonista selectiva de la IL-2 se prepara con vehículos que protegerán la proteína de fusión de agonista selectivo IL-2 contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros

biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioctoésteres y ácido poliláctico. Dichas formulaciones pueden prepararse usando técnicas estándar.

5 **[0060]** Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

ADMINISTRACIÓN

10 **[0061]** Las proteínas de fusión de la presente invención preferiblemente se administran por vía parenteral. La ruta subcutánea es la ruta preferida, pero también se puede usar la administración intravenosa, intramuscular y subdérmica. Para rutas subcutáneas o intramusculares, se pueden usar depósitos y formulaciones de depósito. Para ciertas enfermedades, se pueden utilizar vías de administración especializadas. Por ejemplo, para enfermedades oculares inflamatorias se puede usar la inyección intraocular. Las proteínas de fusión se pueden usar en una concentración de aproximadamente 0,1 a 10 mcg/ml de volumen total, aunque se pueden usar concentraciones en el

15 rango de 0,01 mcg/ml a 100 mcg/ml.

[0062] La determinación de la dosis está dentro del nivel de habilidad ordinaria en la técnica. La dosificación es diaria o semanal durante el período de tratamiento, o puede ser a otra frecuencia intermitente. La administración intravenosa se realizará mediante inyección o infusión en bolo durante un período típico de una a varias horas. También se pueden emplear formulaciones de liberación sostenida. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva de proteínas de fusión de la presente invención es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la condición tratada, tal como un cambio clínicamente significativo en las células Treg circulantes, un cambio clínicamente significativo en las células Treg presentes dentro de un tejido enfermo o un cambio clínicamente significativo en un síntoma de la enfermedad.

20

[0063] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la concentración efectiva semimáxima (CE50; es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una estimulación semimáxima de las células Treg) con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración plasmática circulante que incluya la CE50 determinada en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, p. ej., mediante ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas.

25

30

35

[0064] Tal como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína IL-2 agonista selectivo de fusión (es decir, una eficaz dosis) depende del polipéptido seleccionado y la frecuencia de la dosis. Por ejemplo, se pueden administrar cantidades de dosis única en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 0,1 mg/kg de peso corporal del paciente; en algunas realizaciones, se pueden administrar aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05 mg/kg. Las composiciones pueden administrarse de una vez por día a una o más veces por semana, o una o más veces por mes; incluyendo una vez cada dos días. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, el nivel de células Treg presentes en el paciente y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión de agonista selectivo de IL-2 de Es probable que la invención sea una serie de tratamientos.

40

45

Enfermedades autoinmunes

50 **[0065]** Se han observado algunas de las enfermedades que pueden beneficiarse de la terapia de esta invención. Sin embargo, el papel de las células Treg en las enfermedades autoinmunes es un área muy activa de investigación, y es probable que esta invención identifique enfermedades adicionales como tratables. Las enfermedades autoinmunes se definen como enfermedades humanas en las que el sistema inmunitario ataca sus propias proteínas, células y tejidos. Se puede encontrar una lista completa y una revisión de las enfermedades autoinmunes en *The Autoimmune Diseases* (Rose y Mackay, 2014, Academic Press).

55

Otras proteínas de fusión

60 **[0066]** Debido a que el propósito del resto de proteína Fc en esta invención es únicamente para aumentar la vida media, una circulación experto en la técnica reconocerá que el resto agonista selectivo de la IL-2 podría fusionarse al N-terminal de otras proteínas para lograr el mismo objetivo de aumentar el tamaño molecular y reducir la tasa de depuración renal, utilizando las relaciones estructura-actividad descubiertas en esta invención. El agonista selectivo de IL2 podría fusionarse con el extremo N de la albúmina sérica (Sleep, D., et al., 2013, *Biochim Biophys Acta*. 1830: 5526-34), lo que aumenta el radio hidrodinámico de la proteína de fusión en relación con el resto IL-2 y también es reciclado por el FcRN. Un experto en la técnica también reconocería que el resto agonista selectivo de IL2 de esta

65

invención también podría usarse para el N-terminal de polímeros de aminoácidos recombinantes no inmunogénicos. Dos ejemplos de polímeros de aminoácidos no inmunogénicos desarrollados para este propósito son los polímeros XTEN, cadenas de aminoácidos A, E, G, P, S y T (Schellenberger, V., et al., 2009, Nat Biotechnol. 27: 1186-90), y polímeros PAS, cadenas de residuos de aminoácidos P, A y S (Schlupschy, M., et al., 2007, Protein Eng Des Sel. 20: 273-84).

EJEMPLOS

[0067] Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente y no a modo de limitación. Los expertos reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplo 1. Clonación, expresión y purificación de proteínas de fusión de agonista selectivo de IL-2 con IgG Fc

[0068] Se construyó un ADNc que codifica N88RL9AG1 (SEQ ID NO 4) mediante síntesis de ADN y ensamblaje de PCR. El constructo N88RL9AG1 estaba compuesto por la secuencia señal de IgG1 de ratón, la secuencia de IL-2 humana madura (SEQ ID NO 1) con las sustituciones N88R y C125S, una secuencia de péptido conector de 9 aminoácidos (SEQ ID NO 15) y la región Fc de IgG1 humana que contiene la sustitución N297A (SEQ ID NO 2). N88R/IL2 es un agonista selectivo de IL2 con unión reducida a IL2RB y actividad agonista selectiva en células que expresan el receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Shanafelt, AB, et al., 2000, Nat Biotechnol. 18: 1197-202). La eliminación del sitio de glicosilación unido a N en N297 en IgG1 Fc reduce las funciones efectoras de Fc (Tao, MH, et al., 1989, J Immunol. 143: 2595-2601). D20HLOG2 estaba compuesto por la secuencia señal de IgG1 de ratón, IL-2 (SEQ ID NO 1) con las sustituciones D20H y C125S, y un resto de proteína Fc derivado de IgG2 humana (SEQ ID NO 3). Se ha informado que la variante D20H IL-2 posee actividad agonista selectiva similar a N88R (Cassell, DJ, et al., 2002, Curr Pharm Des., 8: 2171-83).

[0069] Estos ADNc fueron clonados en pcDNA3,1 (+) (Life Technologies, Carlsbad, CA) usando los sitios de restricción HindIII y NotI. El plásmido del vector de expresión purificado que contiene la construcción se transfirió transitoriamente en células HEK293. Las células HEK293 se sembraron en un matraz de agitación 24 horas antes de la transfección, y se cultivaron usando medios químicamente definidos libres de suero. Las construcciones de expresión de ADN se transfectaron transitoriamente en 0,1 litros de células HEK293 en suspensión. Después de 24 horas, se contaron las células para obtener la viabilidad y el recuento de células viables. Los cultivos se recogieron el día 5 y el sobrenadante del medio acondicionado se aclaró por centrifugación a 3000 X g durante 15 minutos. La proteína se purificó pasando el sobrenadante sobre una columna de proteína A (GE Healthcare), eluyendo con ácido acético al 0,25% (pH 3,5), neutralizando la proteína eluida con Tris 1 M (pH 8,0) y dializando contra HEPES 30 mM, pH 7, 150 mM NaCl. Las muestras se filtraron estérilmente a través de un filtro de membrana de 0,2 μ M y se analizaron mediante SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Las proteínas migraron como un dímero unido por disulfuro. La concentración de proteínas determinada por absorbancia utilizando el coeficiente de extinción calculado de 1,11 mg/ml cm^{-1} , y alícuotas almacenadas a -80°C .

[0070] Las citocinas N88R/IL2 y D20H/IL2 son variantes de la SEQ ID NO 1 y fueron producidas en E. coli, esencialmente como se describe en la patente US 6,955,807 B1, excepto por la adición de la mutación adicional C125S para mejorar la estabilidad.

Ejemplo 2. Determinación de la actividad de unión al receptor de N88RL9AG1 y D20HLOG2.

[0071] Para determinar si N88RL9AG1 y D20HLOG2 fueron plegadas correctamente, su afinidad a las subunidades de receptor de IL-2 IL2RA y IL2RB se determinó por resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento Biacore T-200 (GE Healthcare). Las proteínas de dominio extracelular IL2RA e IL2RB y la proteína IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) se inmovilizaron en chips Biacore CM-5 mediante acoplamiento NHS/EDC a valores finales de RU (unidades de resonancia) de 30 y 484, respectivamente. La cinética de la unión a IL2RA se midió a cinco concentraciones de IL2 y N88RL9AG1 que varían de 0,6 nM a 45 nM a un caudal de 50 ul/minuto. La cinética de la unión a IL2RB se midió en cinco concentraciones que van desde 16,7 nM a 450 nM para IL2 y de 14 nM a 372 nM para las proteínas de fusión Fc a una velocidad de flujo de 10 ul/minuto. Las constantes de disociación (Kd) se calcularon a partir de las constantes cinéticas utilizando el software de evaluación Biacore versión 2,0, suponiendo un ajuste 1:1 para IL-2 y el ajuste bivalente para N88RL9AG1 y D20HLOG2. Los valores de equilibrio Kd se calcularon mediante el software de evaluación Biacore utilizando valores de unión en estado estacionario.

[0072] La unión a IL2RA se detectó tanto para IL-2 como N88RL9AG1. El valor Rmax para N88RL9AG1, 14,43, fue 5,5 veces mayor que el de IL2, 2,62, consistente con el hecho de que N88RL9AG1 (82,916 g/M) tiene un mayor peso molecular que IL-2 (15,444 g/M). Los valores de kon, koff y Kd para IL-2 estaban en el rango esperado de los valores publicados de SPR (Tabla II). La afinidad de N88RL9AG1 fue aproximadamente 2 veces mayor que la de IL2 según lo determinado por los métodos cinéticos y de equilibrio. La unión de IL2 a IL2RB se detectó con un Rmax de 6,19. Los valores determinados para kon, koff y Kd están dentro del rango reportado en la literatura. Los valores informados son $3,1 \times 10^{-8}$ M (IL2RA) y $5,0 \times 10^{-7}$ M (IL2RB) (Myszka, DG, et al., 1996, Protein Sci. 5: 2468-78); $5,4 \times 10^{-8}$ M (IL2RA) y $4,5 \times 10^{-7}$ (IL2RB) (Shanafelt, AB, et al., 2000, Nat Biotechnol. 18: 1197-202); y $6,6 \times 10^{-9}$ M (IL2RA) y 2,8

X 10^{-7} M (IL2RB) (Ring, A. M., et al., 2012, Nat Immunol. 13: 1187-95). Esencialmente no se detectó la unión de N88RL9AG1 a IL2RB, con una ligera unión detectada a la concentración más alta probada ($R_{\text{máx}} = 0,06$), muy por debajo de lo esperado en función de la diferencia de peso molecular entre IL2 y N88RL9AG1 y en función de los resultados de unión de IL2RA. La proteína D20HLOG2 también se probó para la unión a IL2RA, y se encontró que tenía una K_d de $8,3 \times 10^{-9}$ M, similar a la de N88RL9AG1. Por lo tanto, los estudios de unión SPR indicaron que las proteínas N88RL9AG1 y D20HLOG2 se unen a IL2RA, lo que indica que las proteínas están plegadas adecuadamente.

Ejemplo 3. Bioactividad de N88RL9AG1 y D20HLOG2 en células T.

[0073] La bioactividad de N88RL9AG1 y D20HLOG2 en las células T se determinó midiendo niveles fosforilados de STAT5 (pSTAT5) en subconjuntos de células T específicas. Los niveles de pSTAT5 se midieron por citometría de flujo en células fijas y permeabilizadas usando un anticuerpo contra un péptido STAT5 fosforilado. Las células Treg expresan constitutivamente CD25, y las células que se encuentran en el 1% superior de los niveles de expresión de CD25 están altamente enriquecidas para las células Treg (Jailwala, P., et al., 2009, PLoS One. 2009; 4: e6527; Long, SA, et al., 2010, Diabetes 59: 407-15). Por lo tanto, los datos de citometría de flujo se seleccionaron en CD25 alto (el 1-2% superior de las células que expresan CD25) y grupos CD25^{-bajos} para los subconjuntos de células T efectoras Treg y CD4, respectivamente.

[0074] Se descongelaron las células T criopreservadas CD4⁺ (Astarte Biologies, Seattle, WA), se lavó en medios X-VIVO 15 (Lonza, Allendale, NJ) que contienen suero AB humano al 1% (Mediatech, Manassas, VA) y se dejó que se recuperaran durante 2 h a 37°C. Las células se distribuyeron en 0,1 ml en tubos de 15x75 mm a una concentración de 5×10^6 células/ml. Las células se trataron con concentraciones variables de proteínas de fusión IL-2 o Fc durante 10 minutos a 37°C. Luego, las células se fijaron con Cytofix Fixation Buffer a 37°C durante 10 minutos, se permeabilizaron con Perm Buffer III (BD Biosciences, Santa Clara, CA) durante 30 minutos en hielo, y luego se lavaron. Luego, las células se tiñeron con una mezcla de anticuerpos anti-CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Santa Clara, CA), anti-CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) y anticuerpos anti-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) en concentraciones recomendadas por el fabricante durante 30 minutos a 20°C, se lavaron y datos de citometría de flujo fueron adquiridos en un instrumento LSR II (BD Biosciences). Los datos se analizaron utilizando el software de análisis Flowjo (Flowjo, Ashland, OR).

[0075] Los resultados con N88RL9AG1 en este ensayo indican que, en comparación con IL-2 N88RL9AG1, tenía notable selectividad para la población Treg (Figura 3A). N88RL9AG1 activó menos del 1% de las células CD4⁺, con una selectividad muy fuerte para las células CD25 altas. En contraste, IL-2 activó más del 80% de las células T CD4⁺ a una concentración de 40 nM, con una alta proporción de las células pSTAT5⁺ que expresan niveles bajos o no expresan CD25. Incluso a 4 pM, la concentración más baja probada, IL-2 todavía estimuló niveles significativos de pSTAT5 tanto en células CD25^{-bajas} como en células CD25 altas.

[0076] D20HLOG2 se ensayó entonces para la actividad en el ensayo de pSTAT5 de células T CD4⁺. Inesperadamente, D20HLOG2 no tuvo actividad en este ensayo (FIGURA 3B). Un control adicional con 10^{-8} M D20H/citocina IL2 (la variante citocina IL-2 no fusionada a Fc) mostró una activación pSTAT5 robusta y selectiva de células CD25 altas (FIGURA 3C). La falta de actividad con D20HLOG2 fue especialmente sorprendente dado que D20HLOG2 se unió a IL2RA con un K_d similar al de IL-2 y N88RL9AG1, lo que indica que se plegó correctamente.

[0077] Para confirmar que las células CD25^{altas} activadas selectivamente por N88RL9AG1 eran Tregs, se construyeron por células activadas tanto para pSTAT5 como FOXP3, otro marcador molecular para las células Treg. Las células CD4⁺ se trataron con IL-2 o N88RL9AG1 4 nM, se fijaron y se permeabilizaron como se describe anteriormente para la tinción con pSTAT5, y luego se trataron posteriormente con 1 ml de tampón permanente FOXP3 (BioLegend, San Diego, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se lavaron y se resuspendieron en FOXP3 Perm Buffer. Las células permeabilizadas se tiñeron con una mezcla de anticuerpos anti-FOXP3-eFluor450, antiCD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) y anti-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) durante 30 minutos a 20°C, se lavaron y analizaron por citometría de flujo. Los resultados de este experimento indicaron que una alta proporción de células tratadas con N88RL9AG1 con STAT5 activado (células pSTAT5⁺) también expresaban altos niveles de FOXP3. Este resultado proporciona evidencia adicional de que las células activadas están altamente enriquecidas para las células Treg. En contraste, las células pSTAT5⁺ tratadas con IL-2 eran FOXP3⁺ y FOXP3⁻, siendo la mayoría células FOXP3⁻.

Ejemplo 4. Determinación de las relaciones estructura-actividad importantes para la bioactividad.

[0078] Los resultados inesperados descritos en el Ejemplo 3 sugirieron que la bioactividad de IL2 detectada con N88RL9AG1 pero no con D20HLOG2 se debía a la presencia de un péptido conector. Para verificar este hallazgo y eliminar la contribución de otras variables, como el isotipo del resto Fc y la mutación de selectividad en el resto IL-2, se diseñó y produjo un panel de análogos, todos utilizando el IgG1 N297A Fc (TABLA III).

[0079] Los ADNc se construyeron y proteínas expresada y purificada como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el residuo C-terminal de lisina del Fc se ha eliminado en todas las construcciones y que los cultivos de células de producción estaban en un volumen de 30 ml en lugar de 100 ml. Todas las proteínas se recuperaron con buen

rendimiento. De hecho, la comparación de los rendimientos de la serie de moléculas N88R/IL2 indicó una clara tendencia de aumentar el rendimiento de proteínas al aumentar la longitud del conector peptídico, con la recuperación de N88RL20AG1 (con el conector peptídico más largo) 6,8 veces mayor que N88RLOAG1 (sin conector peptídico) (FIGURA 5A). La base para el aumento de los rendimientos de las proteínas que contienen péptidos enlazadores aún no está clara, pero podría deberse a un mayor nivel de expresión, mayor velocidad de secreción, mayor estabilidad de la proteína o mayor eficiencia de purificación. Curiosamente, el rendimiento de WTL15AG1 fue solo marginalmente mayor (1,8 veces) que el de WTLOAG1, en comparación con un rendimiento 4,5 veces mayor de N88RL15AG1 en comparación con N88RLOAG1. El rendimiento de D20HL15AG1 fue similar al rendimiento de N88RL15AG1, lo que indica que la mutación de selectividad de IL-2 no tiene un efecto significativo sobre el rendimiento, y ambas proteínas tuvieron rendimientos significativamente más altos (4,3 veces y 3,4 veces, respectivamente) que AG1L15D20H (FIGURA 5B). En conjunto, estos resultados indicaron que el aumento de la longitud del conector peptídico se asoció con un mayor rendimiento de proteínas de fusión Fc que contienen N88R/IL2, que el rendimiento de las proteínas de fusión Fc que contienen *wt* IL-2 fue mucho menos sensible a la presencia de un péptido conector, y se producen proteínas de fusión IL-2-Fc en la configuración X-Fc.

[0080] Estas proteínas purificadas se probaron en un bioensayo pSTAT5 de células T humanas esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, excepto que se usaron células T CD3+ humanas (seleccionadas negativamente), de células CD4+, y las células se incubaron con proteínas de prueba durante 20 minutos en lugar de 10 minutos.

[0081] Los resultados de la serie de moléculas N88R/IL2 mostraron que la bioactividad en la población enriquecida con Treg fue influenciada dramáticamente por la longitud del conector peptídico (FIGURA 6A). La señal de pSTAT5 (% pSTAT5 + células) en la población Treg aumentó progresivamente al aumentar la longitud del conector peptídico. Este aumento de la bioactividad se reflejó tanto en la señal máxima de pSTAT5 en la proteína de prueba 10^{-8} M como en los valores de CE50 (TABLA IV). N88RL20AG1, la proteína con el conector peptídico más largo, mostró un aumento de 4,2 veces en la señal máxima de pSTAT5 sobre N88RLOAG1. Debido a que la señal N88RLOAG1 pSTAT5 no alcanzó el 50% de la activación de IL-2 en su concentración más alta (10^{-8} M), no fue posible determinar la mejora del pliegue en CE50 de las proteínas que contienen péptidos enlazadores sobre N88RLOAG1. Sin embargo, con base en N88RL20AG1 CE50 y la concentración más alta de N88RLOAG1 probada, se puede estimar que N88RL20AG1 exhibirá una CE50 > 100 veces menor que N88RLOAG1.

[0082] Como se esperaba, hubo una actividad esencialmente no detectable de cualquiera de las moléculas N88R/IL2 en la población CD25^{-bajas}, mientras que 10^{-8} M IL2 estimuló la actividad pSTAT5 en 54,2% de las células CD25^{-bajas} (Figura 6B).

[0083] La comparación de WTL0AG1 y WTL15AG1 mostró que péptidos conectores tienen un efecto mucho menos significativo en peso de proteínas de fusión IL2-Fc que las proteínas de fusión N88R/IL2-Fc (Figura 7). En la subpoblación de Treg, tanto WTL0AG1 como WTL15AG1 tenían una bioactividad significativa y, de hecho, estimulaban un nivel máximo de fosforilación de pSTAT5 aproximadamente 2 veces mayor que la IL-2. Sin embargo, WTL0AG1 y WTL15AG1 también estimularon grandes señales de pSTAT5 en células CD25^{-bajas} a una concentración aproximadamente 10 veces mayor. WTL15AG1 y WTLOAG1 exhibieron una diferencia de aproximadamente 10 veces en los valores de CE50 en las poblaciones de células Treg y CD25^{-bajas}.

[0084] La señal de pSTAT5 máximo de D20HL 15AG1 en Tregs fue significativamente menor que la de N88RL15AG1 (Figura 8). Esto sugiere que la falta de actividad detectable en el Ejemplo 3 con D20HL0G2 se debió en parte a una menor actividad del resto D20H/1L2 en el contexto de una proteína de fusión Fc en comparación con el resto N88R/IL2. La actividad de AG1L15D20H fue ligeramente mayor que la de D20HL15AG1, lo que indica que la configuración del resto IL-2 en la proteína de fusión Fc (es decir, X-Fc frente a Fc-X) no tuvo un efecto importante sobre la bioactividad de Treg.

[0085] En conjunto, estos resultados definen características clave de las proteínas de fusión N88R/IL2-Fc necesarias para una bioactividad óptima. Las proteínas N88R/IL2-Fc requieren un péptido conector para una bioactividad de Treg óptima, con una tendencia a aumentar la bioactividad al aumentar la longitud del péptido conector. En segundo lugar, en línea con el trabajo de otros, los péptidos enlazadores tienen un efecto más modesto sobre la bioactividad de las proteínas de fusión Fc que contienen *wt* IL-2. Estos requisitos diferentes para un péptido conector pueden ser consecuencia del hecho de que N88R/IL2 es deficiente en la unión a IL2RB, lo que posiblemente podría dar como resultado requisitos más estrictos para el compromiso del receptor y aumentar la sensibilidad al impedimento estérico del par de proteína de fusión Fc. Estos resultados también definen las proteínas de fusión Fc de Agonista selectivo IL2 más potentes.

60 **Ejemplo 5. Selectividad de proteínas de fusión IL2 SelectiveAgonist-Fc en PBMC humanas**

[0086] Para determinar la selectividad de las proteínas de fusión N88R/IL2-Fc en un contexto biológico más amplio, se desarrolló un ensayo para medir la activación de STATS en todos los tipos clave de células inmunes en PBMC humana no fraccionada cruda. Los PBMC humanos se aislaron por centrifugación Ficoll-Hypaque de un voluntario normal. 10^6 PBMC se suspendieron en X-VIVO15 medios con glucosa (Lonza) y 10% de FBS (Omega), y se trataron con 10^{-8} M proteínas de prueba durante 20 min a 37°C. Luego, las células se trataron con Foxp3/conjunto de tampón

de tinción factor (EBIO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, las células se fijaron con tampón Cytofix y se permeabilizaron con Perm Búfer III como se describe en el Ejemplo 3. Las células fijadas y permeabilizadas se lavaron con FBS/PBS al 1% y se tiñeron con mezcla de anticuerpos durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células teñidas se lavaron en FBS/PBS al 1%, se resuspendieron en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo Fortessa (BD Biosciences). La mezcla de anticuerpos consistió en: anti-CD4-PerCP-Cy5,5 (BD, n° 560650), anti-STAT5-AF-488 (BD, n° 612598), anti-CD25-PE (BD, n° 560989), anti-CD56-PE-CF₅94 (BD, n° 562328), anti-FOXP3-AF647 (BD, n° 560889), anti-CD3-V450 (BD, 560366) y anti-CD8-BV650 (Biolegend, n° 301041). Este procedimiento de tinción permitió el monitoreo de los niveles de pSTAT5 en 7 tipos clave de células inmunes.

[0087] Fenotipos celulares se definen como sigue: las células Treg: CD3+, CD4+, Foxp3+, CD25^{altas}, CD8-, CD56-; células CD4 Teff activadas: CD3+, CD4+, Foxp3-, CD25^{altas}, CD8-, CD56-; células CD4 Teff: CD3+, CD4+, Foxp3-, CD25^{bajas}, CD8-, CD56-; células NKT: CD3+, CD4-, Foxp3-, CD25^{bajas}, CD8-, CD56 +; células NK: CD3-, CD4-, Foxp3-, CD25^{bajas}, CD8-, CD56+; Células B: CD3-, CD4-, Foxp3-, CD25^{bajas}, CD8-, CD56-.

[0088] Las proteínas se ensayaron en este ensayo a una concentración de 10⁻⁸ M. Los resultados, mostrados en la Figura 9 y se resumen en la TABLA V, muestran que N88RL15AG1 exhibió notable selectividad en comparación con peso de IL2 y WTL15AG1, ambos de los cuales activa pSTAT5 en grandes fracciones de todas las poblaciones celulares. N88RL15AG1 estimuló la señal de pSTAT5 en la población Treg cerca del nivel de *wt* IL-2, con activación insignificante de los otros tipos de células con la excepción de las células NK. Un análisis adicional (no mostrado) mostró que las células pSTAT5 + NK tenían un alto contenido de CD25, lo cual es característico de las células brillantes NKCD56, una subpoblación de células NK que también tiene actividad inmunorreguladora (Poli, A, et al., 2009 Immunology. 126 (4): 458-65). Varios tipos de células que tenían señales de pSTAT5 de bajo nivel con N88R/IL2 (células Teff CD4 activadas, células Teff CD4, células T NK y células NK) no presentaban señales pSTAT5 nulas o inferiores con N88RL15AG1. Estos resultados demuestran la actividad y la alta selectividad de N88RL15AG1 para Tregs en un medio biológico complejo.

TABLAS

TABLA I. Proteínas de fusión Fc aprobadas por US FDA y sus características

[0089]

TABLA I

FÁRMACO	Isotipo Fc	Par de fusión	Fusión F vs C	Péptido de enlazador	Vida media (días)
Romiplostim	G1	Péptido TPO-R	C	Y	3,5
Etanercept	G1	P75 TNFa-R	N	N	4,3
Alefacept	G1	LFA3	N	N	10,1
Rilonacept	G1	IL1-R	N	N	8,6
Abatacept	G1	CTLA4	N	N	16,7
Belatacept	G1	CTLA4 (mut)	N	N	9,8
Aflibercept	G1	VEGF R1 + R2	N	N	n/a
Dulaglutida	G4 (mut)	GLP1	N	Y	3,7
Eloctato	G1	FVIII	N	N	0,8
Alprolix	G1	FIX	N	N	3,6

Tabla II. Afinidad de las proteínas de fusión IL-2 Fc para las subunidades IL2RA e IL2RB

[0090]

TABLA II

Ligando	Analito	Método	K _{on}	K _{off}	K _d (M)
IL2RA	IL-2	Cinético	5,85 X 10 ⁶	8,4 X 10 ⁻²	1,44 X 10 ⁻⁸
	N88RL9AG1	Cinético	1,78 X 10 ⁶	1,0 X 10 ⁻²	5,63 X 10 ⁻⁹
	D20HLOG2	Cinético	1,66 X 10 ⁷	0,137	8,30 X 10 ⁻⁹
	IL-2	Equilibrio	-	-	1,47 X 10 ⁻⁸
IL2RB	N88RL9AG1	Equilibrio	-	-	9,36 X 10 ⁻⁹
	IL-2	Cinético	5,85 X 10 ⁶	3,0 X 10 ⁻¹	5,87 X 10 ⁻⁷
	N88RL9AG1	Cinético	Nd	Nd	-
	IL-2	Equilibrio	-	-	2,53 X 10 ⁻⁷
	N88RL9AG1	Equilibrio	-	-	7,60 X 10 ⁻²

Nd: enlace no detectado

TABLA III

Proteína	IL2	Enlazador de péptido	Configuración	SEQ ID No
N88RL0AG1	N88R	0	X-Fc	6
N88RL5AG1	N88R	5	X-Fc	7
N88RL10AG1	N88R	10	X-Fc	8
N88RL15AG1	N88R	15	X-Fc	9
N88RL20AG1	N88R	20	X-Fc	10
WTL0AG1	wt	0	X-Fc	11
WTL15AG1	wt	15	X-Fc	12
D20HL15AG1	D20H	15	X-Fc	13
AG1L15D20H	D20H	15	Fc-X	14

TABLA IV

Proteína	CE50	Máxima respuesta pSTAT5 a 10 ⁻⁸ M	Incremento de pliegue en la respuesta pSTAT5 máxima
N88RLOAG1	>10 ⁻⁸	0,33	1,0
N88KLSAG1	>10 ⁻⁸	0,52	1,6
N88KL9AG1	7 X 10 ⁻¹⁰	0,96	2,9
N88RL10AG1	9 X 10 ⁻¹⁰	0,90	2,7
N88RL15AG1	4 X 10 ⁻¹⁰	1,22	3,7
N88RL20AG1	1 X 10 ⁻¹⁰	1,40	4,2

TABLA V

	Control	IL-2	WTL15AG1	N88R/IL2	N88RL15AG1
Células Treg	0,8	99,9	99,8	99,9	75,1
Células CD4 Teff activadas	0,1	70,5	65,2	3,7	0,1
Células CD4 Teff	0,2	60,9	40,0	2,4	0,5
Células CD8 Teff	0,1	90,2	35,4	2,3	0,1
Células NKT	0,5	74,9	60,5	20,5	5,2
Células NK	0,3	96,8	96,1	49,9	19,3
Células B	0,1	20,9	10,6	0,2	0,1

Porcentaje de células pSTAT5 + eN7tipos de células inmunes en humanos PBMC. Las células fueron tratadas con las proteínas indicadas en los encabezados de columna y se analizaron como se describe en el Ejemplo 6.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0091]

SEQ ID NO.1
 >IL-2 humana !
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSIISTLT

10

SEQ ID NO.2
 >IgG1 humana(N297A) Fc
 DKHTTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

15

SEQ ID NO.3
 >IgG12 humana Fc
 VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 FRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

20

SEQ ID NO.4
 >N88RL9AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGAGGGGDKTHTCPP
 CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

25

SEQ ID NO.5
 >D20HLOG2
 APTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTVECPAPPVAGPSVFL
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

35

SEQ ID NO.6
 >N88RL0AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTDKHTTCPAPPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
 WLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG*

40

SEQ ID NO.7
 >N88RL5AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSDKHTTCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG*

50

SEQ ID NO.8
 >N88RL10AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKHTTCP
 PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG*

55

SEQ ID NO.9
 >N88RL15AG1
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS
 KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDK
 THTCPAPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA

65

5 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO.10
>N88RL20AG1

10 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGG
GGSDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG*

15 SEQ ID NO.11
>WTL0AG1

20 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTDKTHTCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

25 SEQ ID NO.12
>WTL15AG1

30 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGSDK
THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

35 SEQ ID NO.13
>D20HL15AG1

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQS
KNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGSDK
THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

45 SEQ ID NO.14
>AG1L15D20H

50 DKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLE
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT*

55 SEQ ID NO.15
>L9
GGGGAGGGG

60 SEQ ID NO.16
>L5
GGGGS

65 SEQ ID NO.17
>L10
GGGGSGGGGS

SEQ ID NO.18
>L15
GGGGSGGGSGGGGS

70 SEQ ID NO.19
>L20
GGGGSGGGSGGGSGGGGS

75

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una proteína de fusión, que comprende:
- 10
- a. una proteína variante de IL-2 humana N-terminal que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que comprende la sustitución C125S y una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: N88R, N881, N88G, D20H, Q126L y Q126F;
 - b. una proteína C-terminal IgG Fc; y
 - c. un péptido conector de entre 5 y 20 residuos de aminoácidos colocados entre la proteína variante IL-2 y la proteína IgG Fc.
- 15
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la proteína IgG Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos que reducen las funciones efectoras de la proteína IgG Fc
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.
- 20
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
- 25
5. Una proteína dimérica, que comprende dos cadenas idénticas, en donde cada cadena comprende una proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y en donde las dos cadenas están unidas entre sí a través de residuos de cisteína en la proteína IgG Fc.
- 30
6. La proteína dimérica de la reivindicación 5, en donde la proteína variante IL-2 comprende la sustitución N88R.
7. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o la proteína dimérica de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35
8. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
9. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la proteína dimérica de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para usar en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 40
10. Un método *in vitro* para medir el número de células T reguladoras en una muestra de sangre humana mediante el contacto de las células sanguíneas humanas con la proteína de fusión de la reivindicación 1 a una concentración entre 1 nM y 0,01 nM, y luego detectar las células que se unen a la proteína por la citometría de flujo.

45

50

55

60

65

FIGURA 1

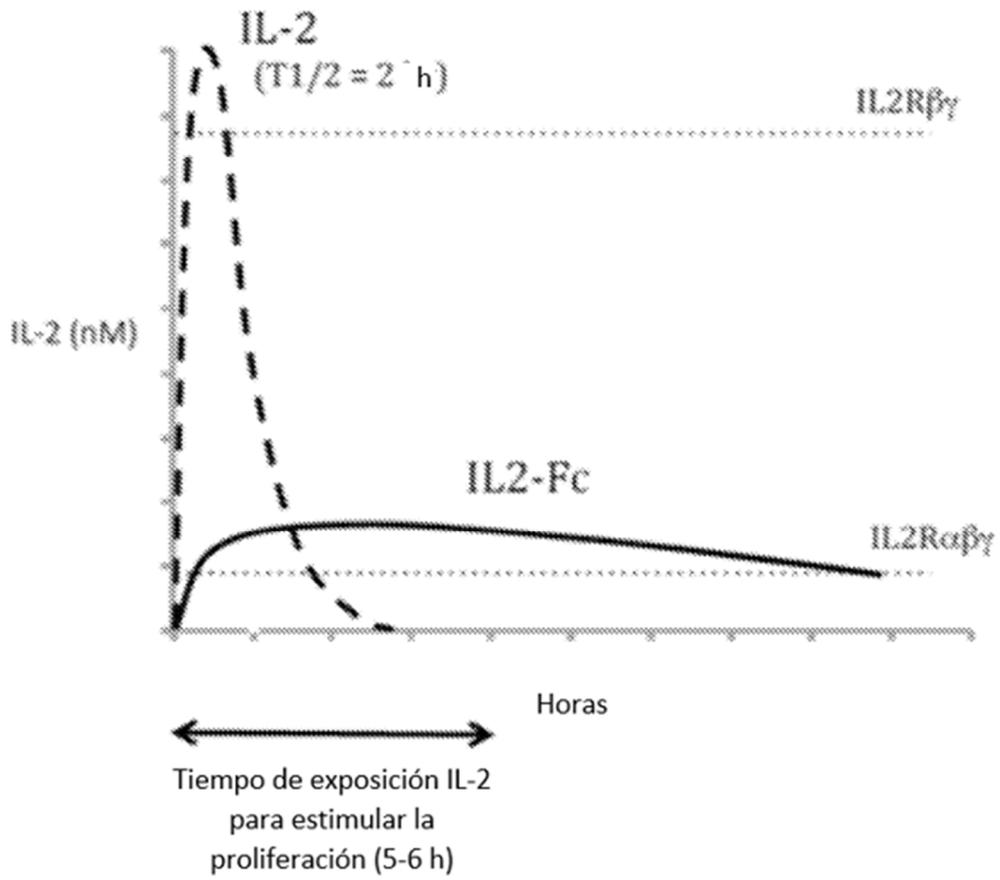


FIGURA 2

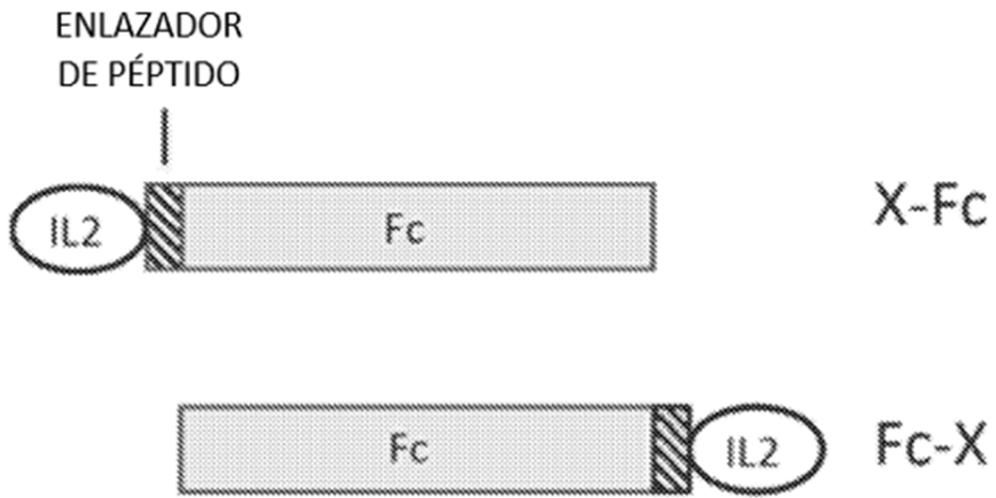


FIGURA 3A

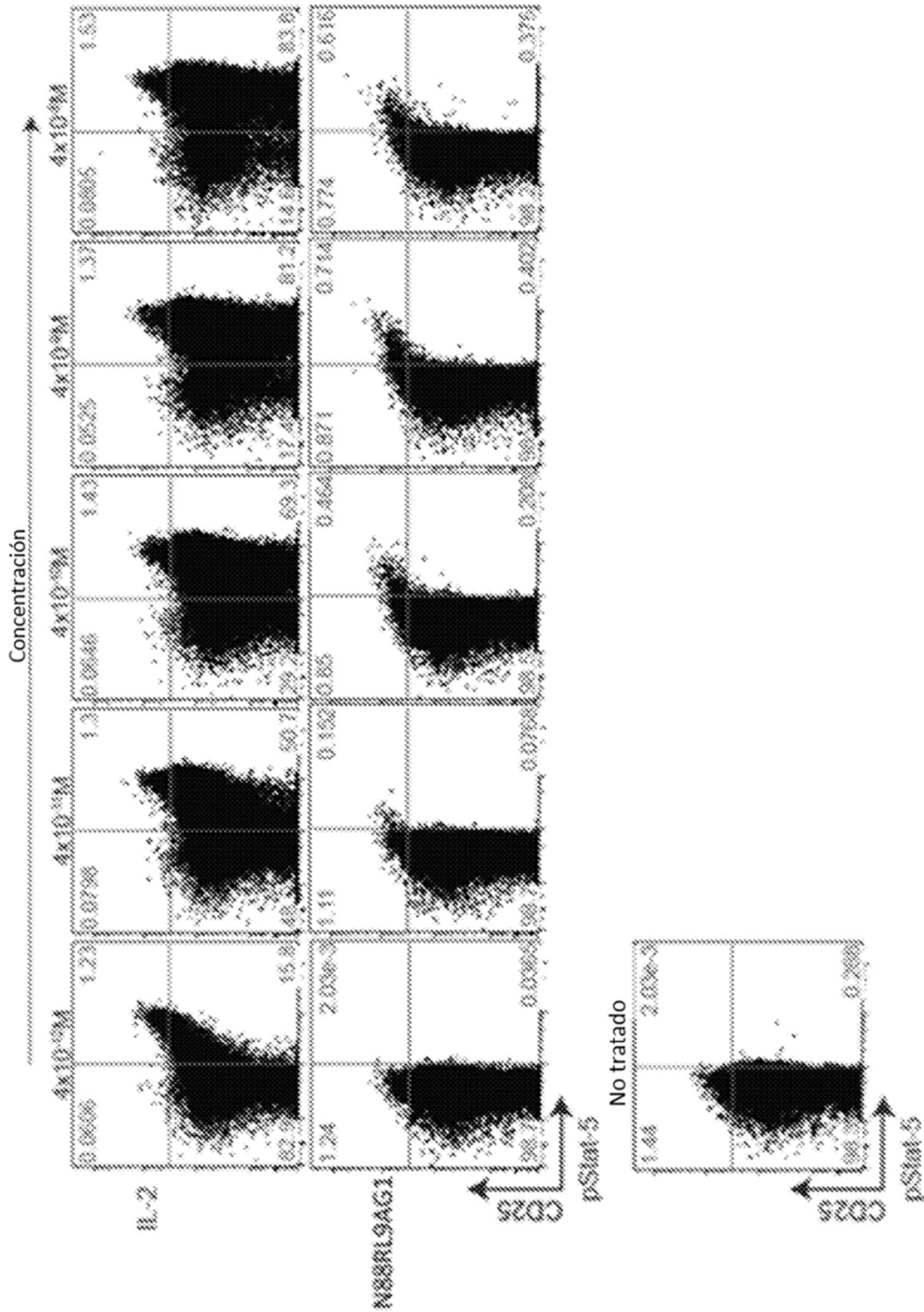


FIGURA 3B

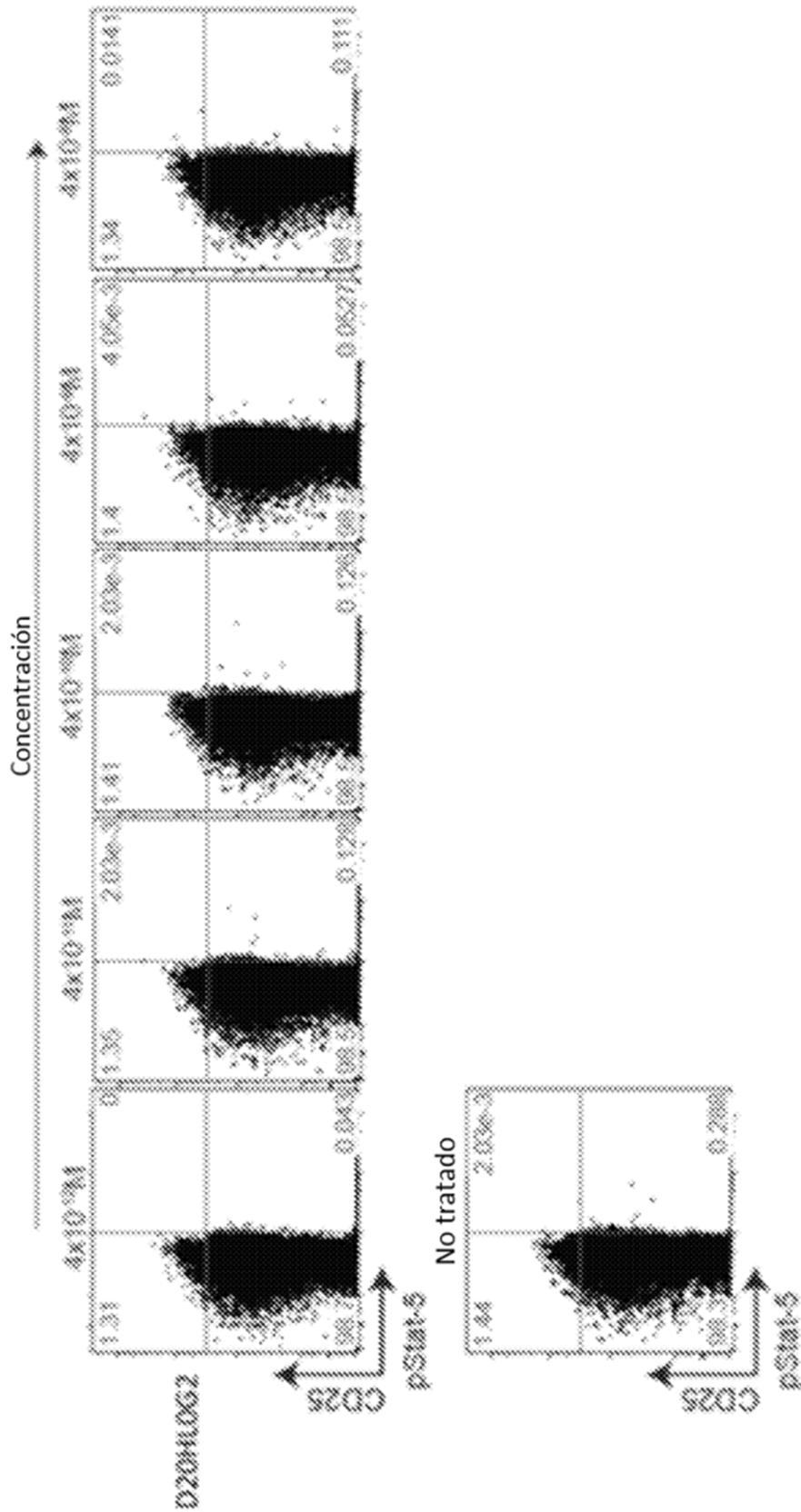


FIGURA 3C

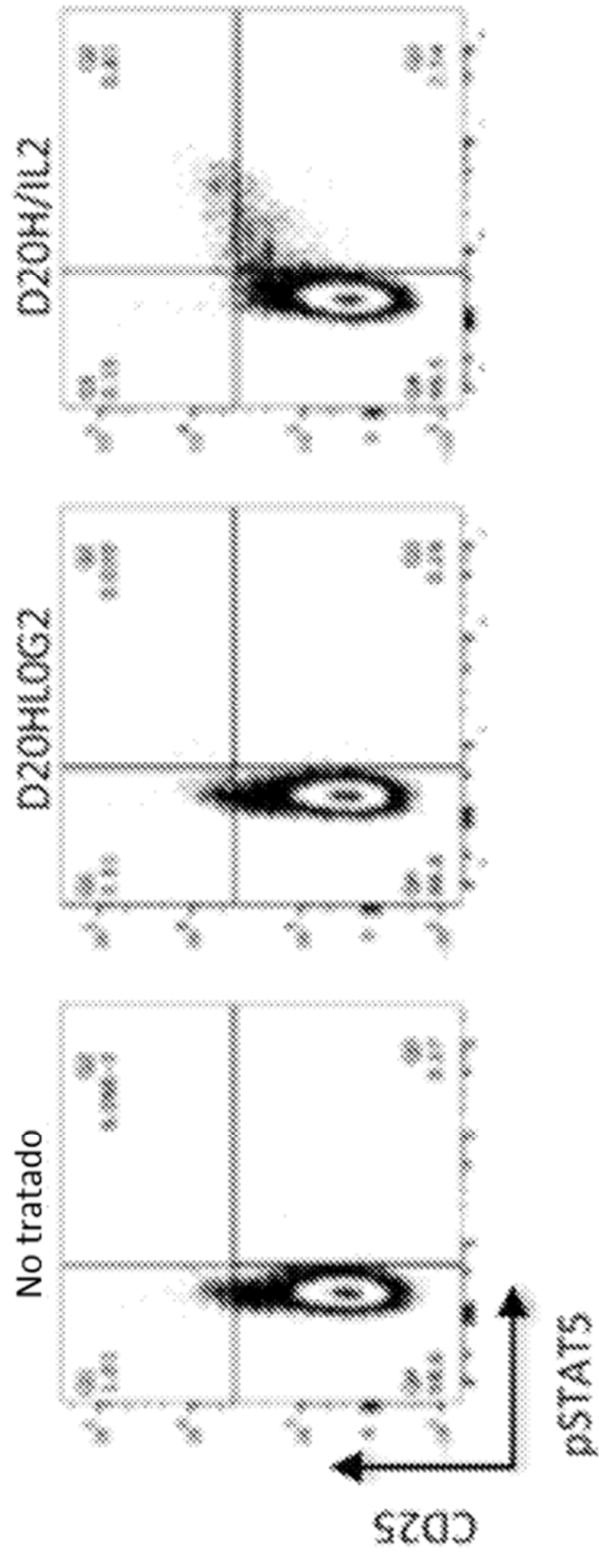


FIGURA 4

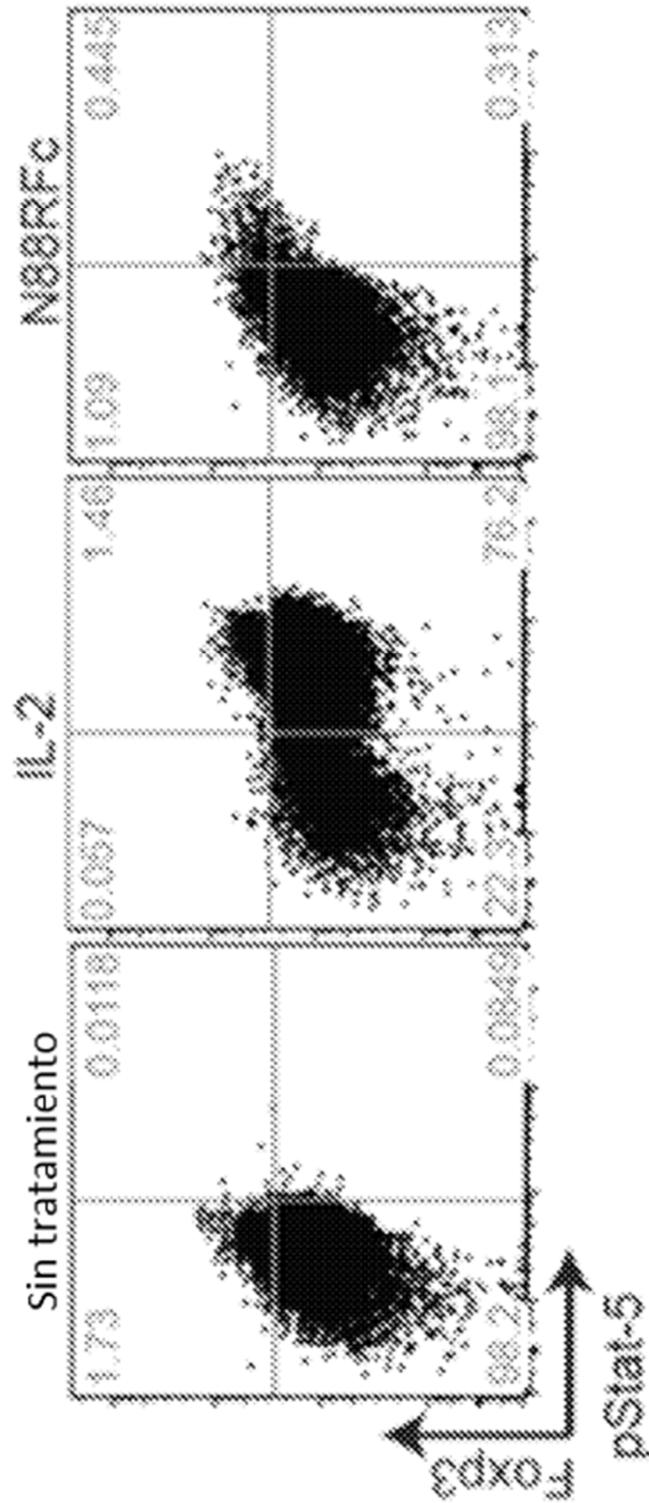


FIGURA 5A

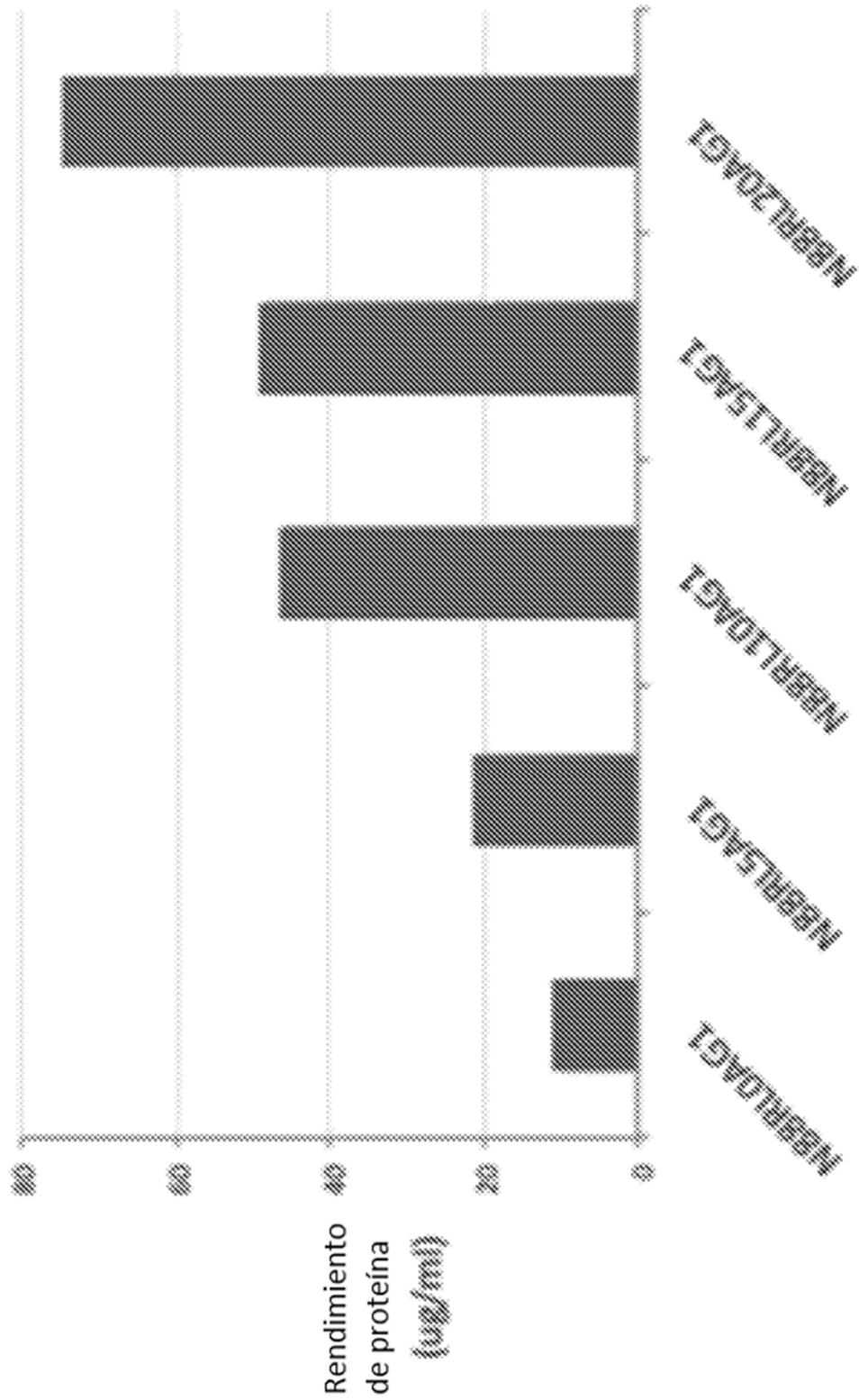


FIGURA 5B

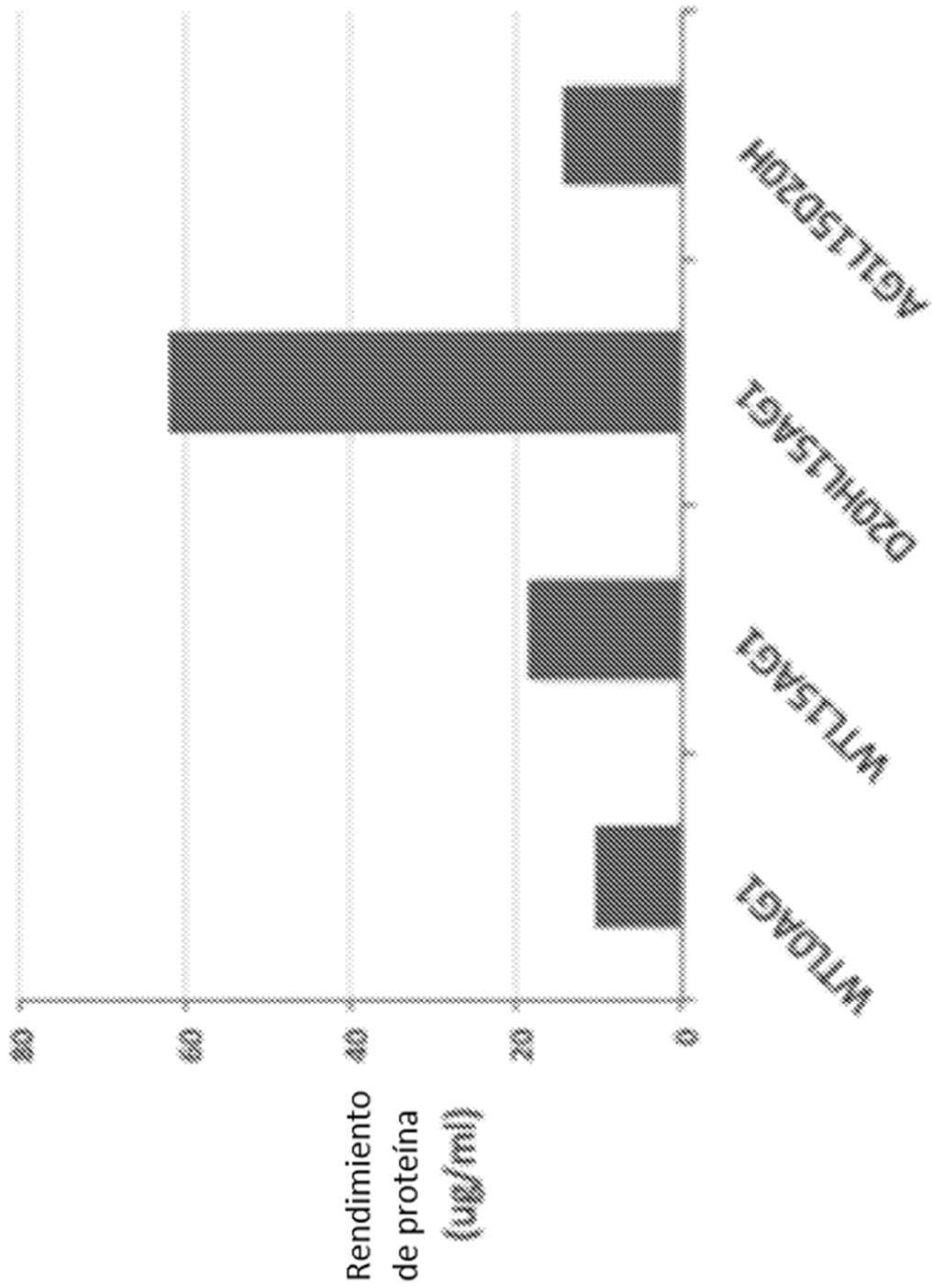


FIGURA 6A

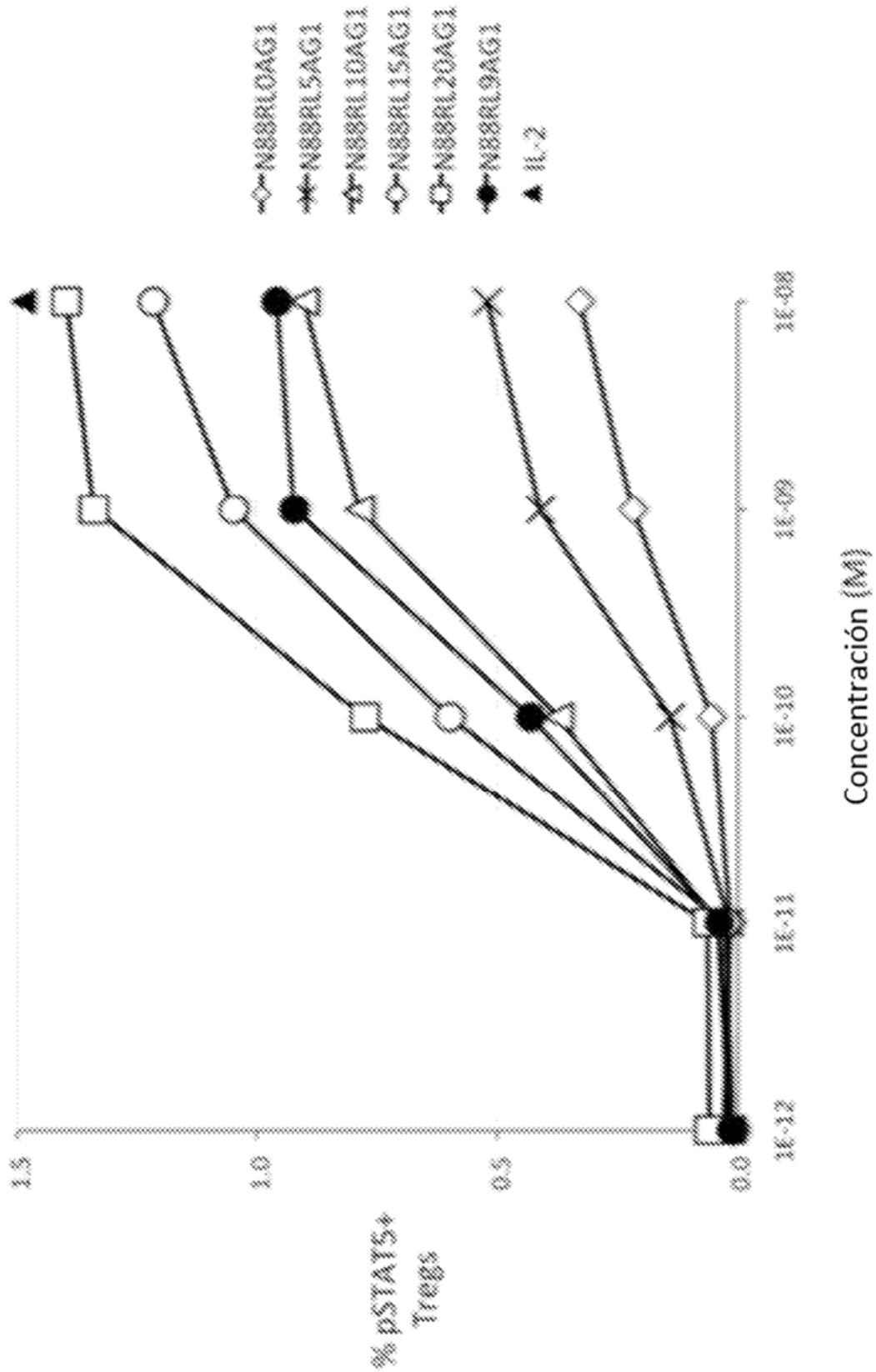


FIGURA 6B

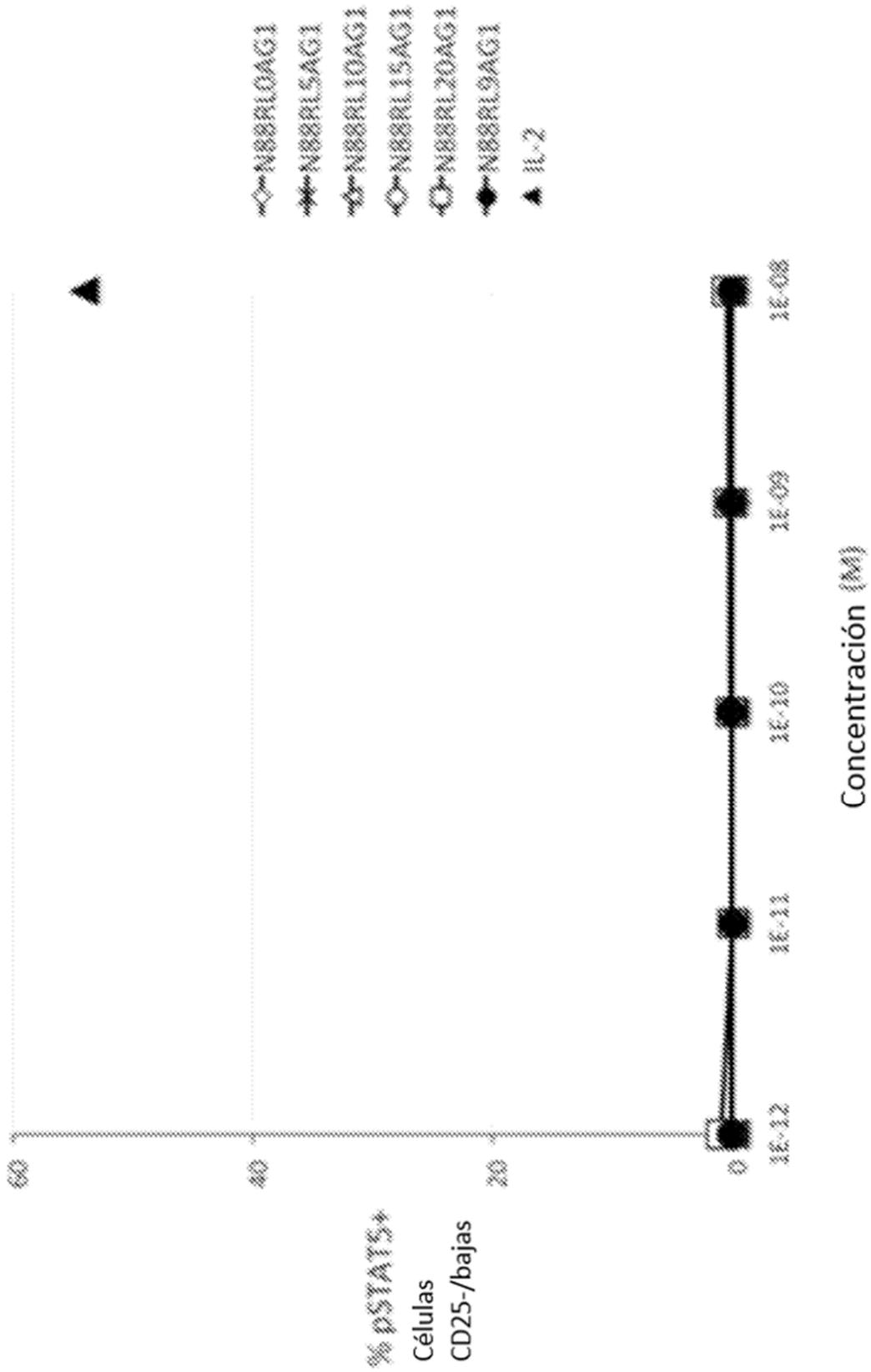


FIGURA 7

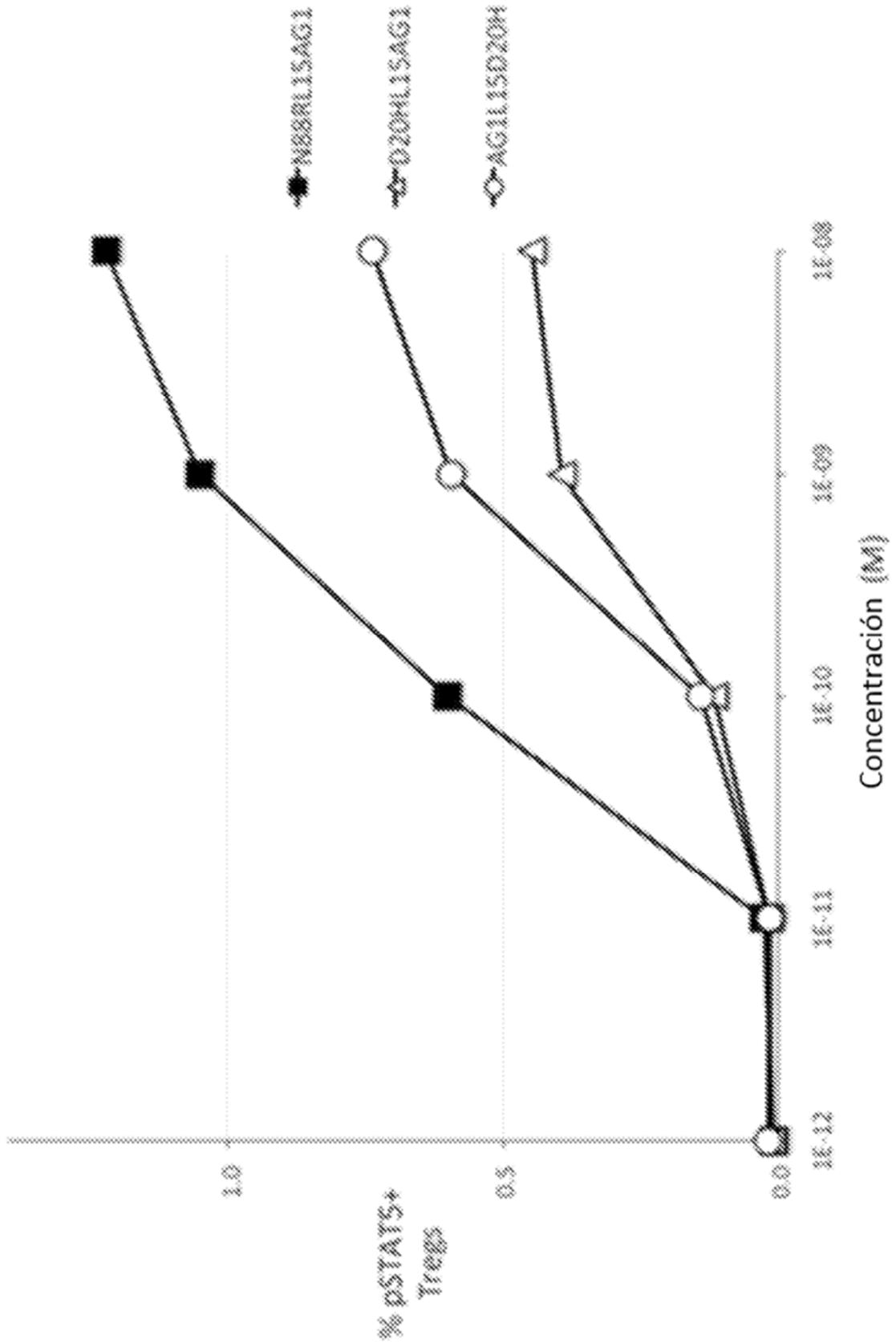


FIGURA 8A

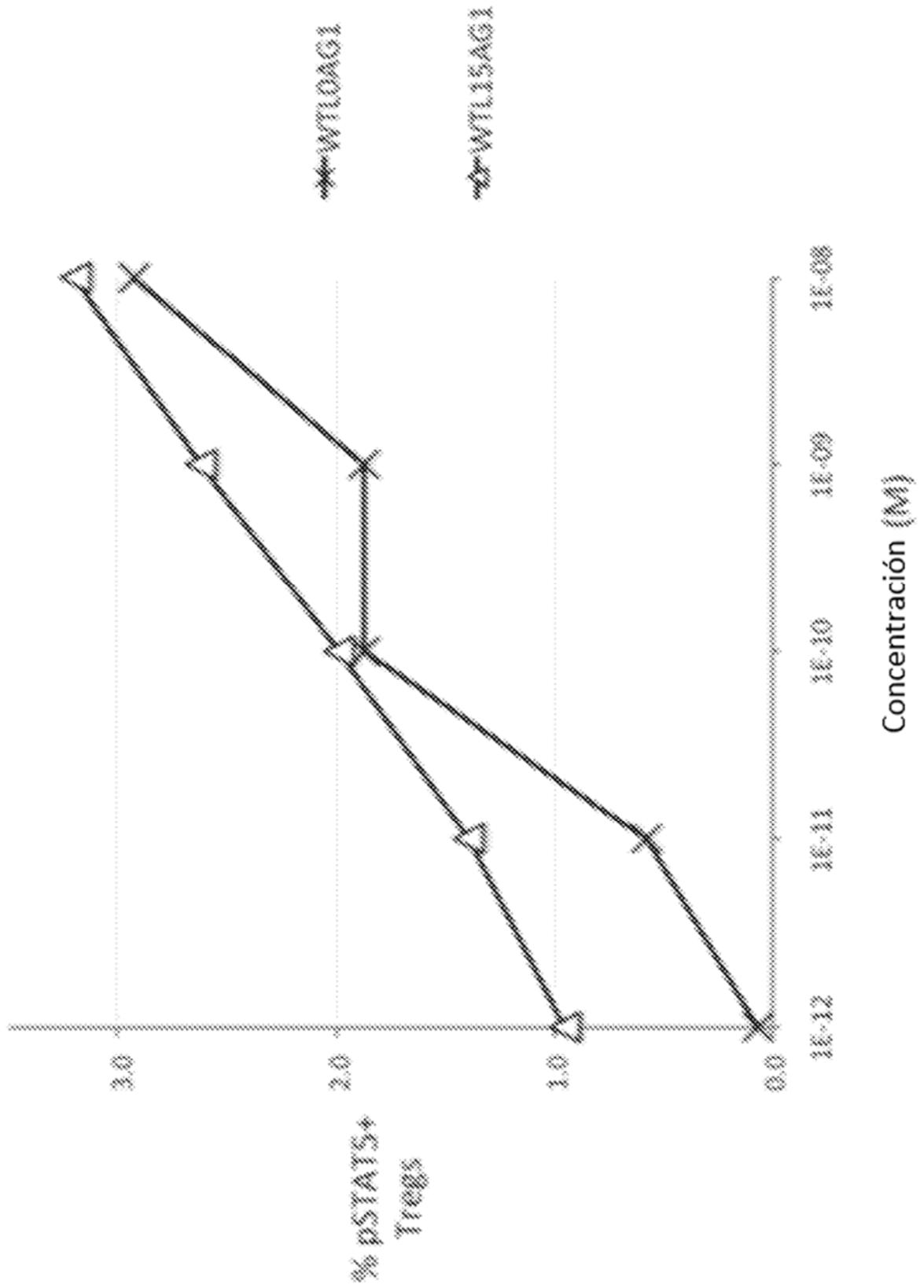


FIGURA 8B

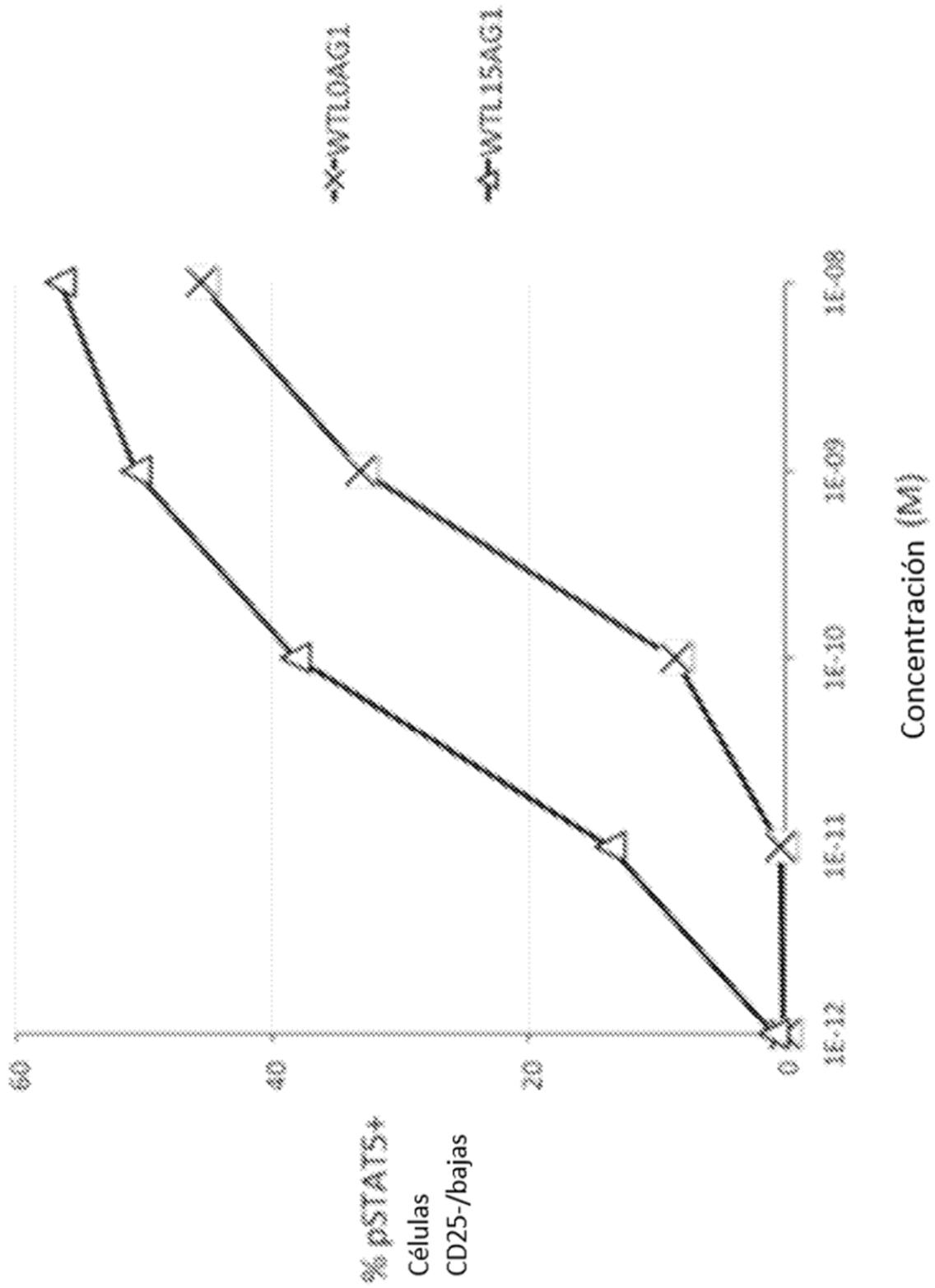


FIGURA 9

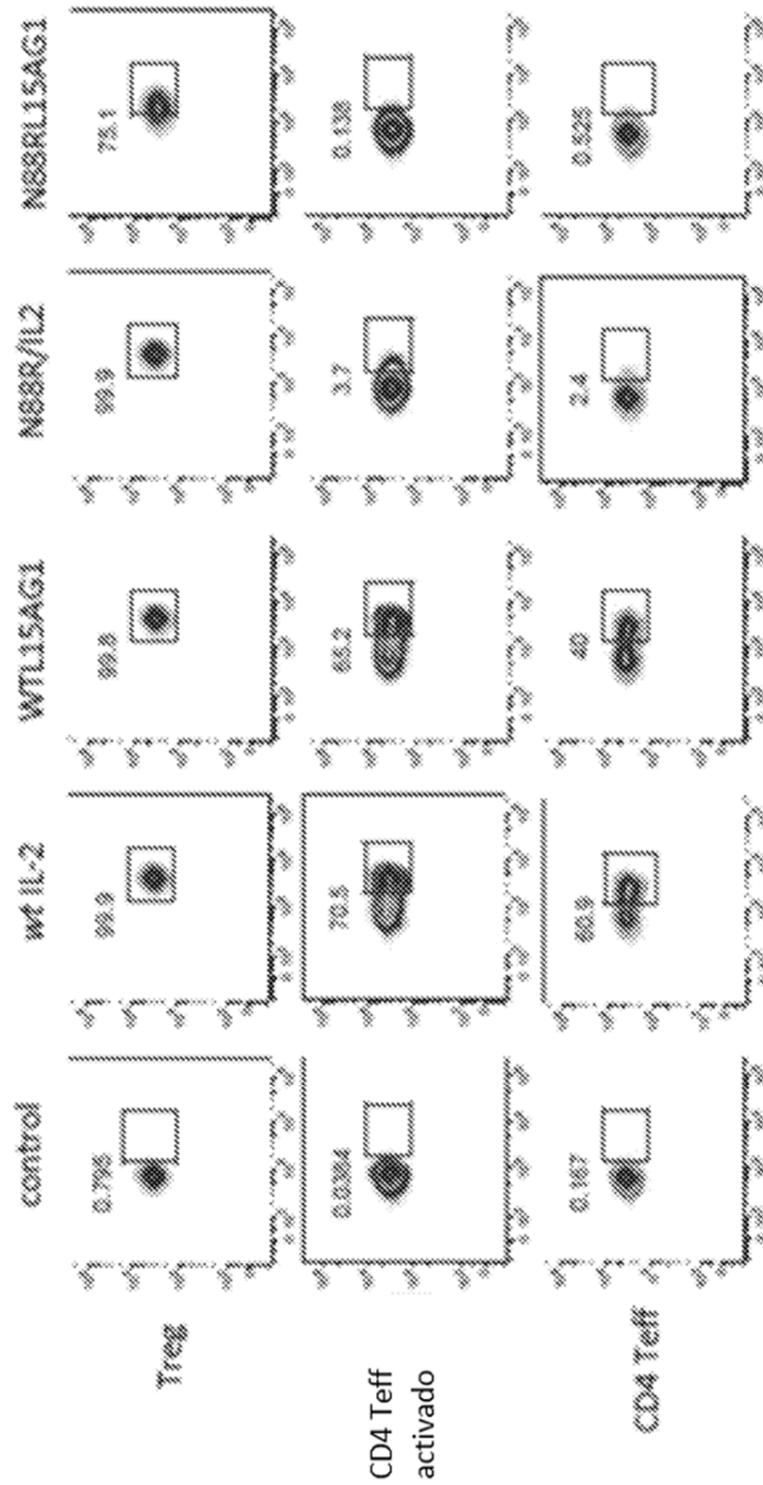


FIGURA 9 (cont.)

