

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 260**

51 Int. Cl.:

C07K 14/55 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2015 E 18215282 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3482766**

54 Título: **Variantes de IL-2 modificadas que activan selectivamente las células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

11.08.2014 US 201462070016 P

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

22.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GREVE, JEFFREY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 807 260 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

Variantes de IL-2 modificadas que activan selectivamente las células T reguladoras para el tratamiento de enfermedades autoinmunes

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El sistema inmunológico debe ser capaz de discriminar entre auto y no auto. Cuando falla la auto/no auto discriminación, el sistema inmunológico destruye las células y los tejidos del cuerpo y como resultado causa enfermedades autoinmunes.

Las células T reguladoras suprimen activamente la activación del sistema inmune y previenen la auto reactividad patológica y la consiguiente enfermedad autoinmune. El desarrollo de fármacos y métodos para activar selectivamente las células T reguladoras para el tratamiento de la enfermedad autoinmune es un tema de intensa investigación y, hasta el desarrollo de la presente invención, ha sido en gran medida sin éxito.

Las células T reguladoras (Treg) son una clase de células T CD4+CD25+ que suprimen la actividad de otras células inmunitarias. Los Treg son fundamentales para la homeostasis del sistema inmunitario y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos propios y en la modulación de la respuesta inmunitaria a los antígenos extraños. Se ha demostrado que múltiples enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la diabetes tipo 1 (T1D), el lupus eritematoso sistémico (LES) y la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) tienen una deficiencia en el número de células Treg o función Treg. En consecuencia, hay un gran interés en el desarrollo de terapias que aumentan los números y/o la función de las células Treg.

Un enfoque de tratamiento para enfermedades autoinmunes que se investiga 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 enfermedad y en varios ensayos clínicos humanos en etapas iniciales, 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 característicamente expresan altos niveles constitutivos del receptor de alta afinidad IL-2, 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 dosis bajas del tratamiento con IL-2 de la 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 niveles elevados de Treg y signos de eficacia clínica. Se han iniciado nuevos ensayos clínicos que investigan la eficacia de la IL-2 en muchas otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

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. Proleucina está aprobada para el tratamiento del melanoma metastásico y el cáncer renal metastásico, pero sus efectos secundarios son tan graves que solo se recomienda su uso en un entorno hospitalario con acceso a cuidados intensivos (dirección web: www.proleucina.com/assets/pdf/proleucina.pdf). Hasta la caracterización más reciente de las células Treg, se consideraba que la IL-2 era un estimulador del sistema inmunitario, activando las células T y otras células inmunitarias para eliminar las células cancerosas. Los ensayos clínicos de IL-2 en enfermedades autoinmunes han empleado dosis más bajas de IL-2 para atacar a las células Treg, porque las células Treg responden a concentraciones más bajas de IL-2 que muchos otros tipos de células inmunitarias 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 como resultado problemas de seguridad y tolerabilidad, y los tratamientos utilizados emplearon inyecciones subcutáneas diarias, ya sea de forma crónica o en cursos de tratamiento intermitentes de 5 días. Por lo tanto, existe la necesidad de una terapia de enfermedad autoinmune que potencie los números 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 más tolerable y que se administre con menos frecuencia.

Un enfoque para mejorar el índice terapéutico de la terapia basada en IL-2 es el uso de variantes de IL-2 que son selectivas para las células Treg relativas a otras células inmunes. Los receptores de IL-2 se expresan en una variedad de diferentes tipos de células inmunitarias, incluidas las células T, las células NK, los eosinófilos y los monocitos, y este amplio patrón de expresión probablemente contribuye a su efecto pleiotrópico en el sistema inmunitario y a su 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 de 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 de 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 en consecuencia tienen una

afinidad reducida para el complejo del 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 receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$. Una de estas variantes, IL2/N88R (Bay 50-4798), se ensayó clínicamente como una versión de baja toxicidad de IL-2 como estimulador del sistema inmunológico, basada en la hipótesis de que las células NK 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, TA, et al., 2008, J Interferón Cytokine Res., 28: 89-100). Estos ensayos clínicos mostraron que Bay 50-4798 era considerablemente más seguro y más tolerable que Proleucina, y también mostró que aumentaba los niveles de células T CD4+CD25+, una población celular enriquecida en células Treg. Posteriormente a estos ensayos, la investigación en el campo estableció de manera más completa 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). Sobre la base de esta nueva investigación, ahora se puede entender que los agonistas selectivos de IL2R $\alpha\beta\gamma$ deben ser selectivos para las células Treg.

Un segundo enfoque para mejorar el índice terapéutico de una terapia basada en IL-2 es optimizar la farmacocinética de la molécula para estimular máximamente las células Treg. Los primeros estudios de 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, la IL-2 tiene una vida media 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, el mantenimiento de IL-2 circulante en o por encima del nivel necesario para estimular la proliferación de células T durante la duración necesaria requiere dosis altas que den lugar a niveles máximos de IL-2 significativamente superiores a la CE₅₀ para las células Treg o requerirán frecuente administración (FIGURA 1). Estos altos niveles pico de IL-2 pueden activar los receptores IL2R $\beta\gamma$ y tienen otros efectos adversos no deseados. Un análogo de IL-2 con una vida media en circulación más larga que la IL-2 puede alcanzar una concentración de fármaco objetivo durante un período específico de tiempo a una dosis más baja que la IL-2 y con niveles máximos más bajos. Por lo tanto, tal análogo de IL-2 requerirá dosis más bajas o una administración menos frecuente que la IL-2 para estimular eficazmente las células Treg. La administración subcutánea menos frecuente de un medicamento IL-2 también será más tolerable para los pacientes. Un agente terapéutico con estas características se traducirá clínicamente en una mejor eficacia farmacológica, una toxicidad reducida y un mejor cumplimiento de la terapia por parte del paciente.

Un enfoque para extender la vida media de las proteínas terapéuticas es conjugar la proteína terapéutica con un polímero no inmunógeno soluble en agua como polietilenglicol (PEG). La conjugación química de una proteína a una molécula de PEG (PEGilación) aumenta la vida media circulante al aumentar el radio hidrodinámico efectivo de la proteína, reduciendo así la velocidad a la que el conjugado de proteínas se filtra de la sangre por el riñón. Los agonistas selectivos de IL-2 e IL-2 son proteínas relativamente pequeñas de aproximadamente 15.000 daltons (15 kDa) con una tasa rápida de depuración renal. La vida media en circulación de las moléculas de PEG aumenta en proporción al peso molecular del PEG (Yamaoka, T., et al., 1994 J Pharm Sci. 83: 601-6).

Hay una serie de factores que influyen sobre la producción exitosa y la fabricación de proteínas terapéuticas PEGiladas. Primero, debido a que las proteínas PEGiladas se preparan mediante la conjugación química de una molécula de PEG y una proteína, es importante que la proteína pueda fabricarse de manera eficiente debido a los pasos de fabricación adicionales involucrados con la PEGilación. En segundo lugar, el resto de PEG debe conjugarse eficazmente con la proteína a través de un residuo de aminoácido específico, lo que lleva a un producto homogéneo con alto rendimiento. En tercer lugar, el sitio de PEGilación en la proteína debe elegirse de modo que interfiera mínimamente con la actividad terapéutica de la proteína. La interferencia con la actividad terapéutica de la proteína podría deberse a la conjugación del PEG con el sitio activo de la proteína, o podría deberse a la inhibición estérica del sitio activo por el PEG. Como ejemplo, se informó previamente una forma de IL-2 PEGilada en la que las moléculas de PEG se conjugaron con aminos primarias en IL-2, dando como resultado una mezcla heterogénea de especies de proteínas que contiene entre uno y cuatro polímeros de PEG por molécula de IL-2 (Katre, NV et al., 1987 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 84: 1487-91; Knauf, MJ, et al., 1988 J Biol Chem. 15; 263: 15064-701988) que mostró una actividad biológica reducida de 4-6 veces relativa a IL-2 (Chen, SA, 2000 J Pharmacol Exp Ther. 293: 248-59). Debido a que el agonista selectivo de IL-2 debe unirse y activarse a un complejo de tres subunidades receptoras en células Treg, el sitio de conjugación apropiado en IL-2 debe elegirse cuidadosamente para una bioactividad óptima.

Esta invención se refiere a variantes de IL-2 con sustituciones de aminoácidos individuales en posiciones específicas en la secuencia de IL-2 que permiten la conjugación química estable y específica de moléculas de PEG al tiempo que conserva la capacidad del conjugado de IL-2-PEG para activar Treg Células. Estas posiciones de aminoácidos especificadas, definidas como *sitios de conjugación de PEG*, se eligen de modo que el conjugado de IL-2-PEG resultante de la conjugación de una molécula de PEG a la variante de IL-2 tenga un mínimo impedimento en su capacidad para unirse y activar el receptor de IL2R $\alpha\beta\gamma$. Esta invención también se refiere a variantes de IL-2 con los sitios de conjugación de PEG mencionados anteriormente en variantes de IL-2 que son selectivas para el

receptor de IL2R $\alpha\beta\gamma$ y, por consiguiente, tienen una alta selectividad para las células Treg.

PEG activados químicamente se han desarrollado con un número de diferentes grupos químicamente reactivos para la conjugación a las proteínas, lo que permite la conjugación a los residuos de aminoácidos que contienen aminas primarias o a grupos tiol. De estos, los grupos tiol, presentes de forma única en los residuos de cisteína, permiten la conjugación más selectiva de PEG a proteínas, y los PEG con maleimida o yodoacetamida reaccionan muy selectivamente con los tioles de cisteína libres. La mayoría de los residuos de cisteína en las proteínas extracelulares participan en enlaces disulfuro que estabilizan la conformación de la proteína, y la pequeña cantidad de residuos de cisteína libres (no pareados) generalmente se entierran en el interior de las proteínas (Petersen, MT, et al., 1999 Protein Eng. 1999 12: 535-48). La conjugación de PEG para liberar residuos de cisteína en una proteína requiere un residuo de cisteína libre expuesto natural o la introducción de un nuevo residuo de cisteína libre. La ingeniería de una nueva cisteína libre en una proteína conlleva el riesgo de que la nueva cisteína introducida pueda formar un enlace disulfuro intracadena inadecuado con otras cisteínas, lo que provoca un plegado incorrecto de la proteína o puede formar enlaces disulfuro entre cadenas con otras moléculas, lo que provoca la agregación de proteínas. Las variantes de IL-2 con residuos de cisteína mutados pueden mostrar una actividad sustancialmente reducida debido a enlaces disulfuro mal apareados (Wang, A., et al., 1984 Science. 224: 1431-3). La presente invención se centra en la ingeniería de nuevos residuos de cisteína libres en proteínas variantes de IL-2 que serán compatibles con el plegamiento de proteínas adecuado, que permita la conjugación específica del sitio de un PEG reactivo con tiol, y da como resultado un conjugado IL-2-PEG que retiene la capacidad de unirse y activar el IL2R $\alpha\beta\gamma$ en Tregs.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La 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 IL-2-PEG con vida media aumentada. La línea discontinua representa el nivel en sangre a lo largo del tiempo de IL-2 después de una inyección subcutánea, y la línea sólida representa el nivel en sangre a lo largo del tiempo de un conjugado de IL2-PEG. Las líneas de puntos 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 doble punta indica la duración de la exposición (5-6 h) a IL-2 a la CE₅₀ necesaria para estimular la proliferación celular.

La FIGURA 2 representa la estrategia para determinar los sitios de unión para PEG u otra conjugación de polímeros no inmunogénicos. La IL-2 se representa en complejo con las tres subunidades del receptor de alta afinidad IL-2. Los residuos de aminoácidos de superficie de IL-2 expuestos a solventes que no interactúan con las subunidades del receptor de IL-2 son residuos de aminoácidos candidatos para la unión de polímeros de PEG dentro de un círculo.

La FIGURA 3 muestra la estructura cristalina 3-D del complejo IL-2/IL2R $\alpha\beta\gamma$, que indica las cadenas laterales de aminoácidos de los residuos que cumplen los criterios para unir PEG u otros polímeros no inmunogénicos. Los residuos indicados son T3C, S6C, K8C, K48C, K49C, T51C, K97C, G98C, F103C, M104C, E106C y D109C. IL-2 se indica en el primer plano central, IL-2RB a la izquierda, IL-2RT a la derecha), e IL-2RA en la parte superior y trasera. La orientación del complejo receptor en relación con la membrana celular está indicada por la flecha.

La FIGURA 4 muestra la activación selectiva de pSTAT5 por IL2/N88R/C125S/D109C e IL2/N88R/C125S/D109C PEGilada en una subpoblación de células T enriquecida para células Treg. Las PBMC humanas se incubaron con las muestras indicadas en la parte superior de cada parcela durante 10 minutos a 37°C, se fijaron, se permeabilizaron, se tiñeron con anticuerpos y luego se sometieron a citometría de flujo. Los gráficos FACS se muestran en modo pseudocolor. Se muestran las células agrupadas como CD4+, y las células se clasificaron adicionalmente 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 células que expresan CD25, una población enriquecida para células Treg. Las células no tratadas se incubaron en medios solos, se añadió IL-2 a una concentración de 4×10^{-9} M, y se agregaron muestras de IL2/N88R/C125S/D109C e IL2/N88R/C125S/D109C-PEG a una concentración de 4×10^{-8} M y las muestras tratadas con PEG se incubaron en una reacción de PEGilación simulada que contenía la misma cantidad de PEG que IL2/N88R/C125S/D109C-PEG. IL-2 estimula una cantidad masiva de fosforilación STAT5 tanto en células CD25^{bajo/-} y CD25^{alto}. Tanto el IL2/N88R/C125S/D109C como el IL2/N88R/C125S/D109C-PEG tienen un efecto cualitativo y cuantitativamente diferente, estimulando la fosforilación de STAT5 principalmente en menos del 1% de las células y principalmente en células con CD25^{alto}.

La FIGURA 5 demuestra la selectividad de las proteínas agonistas selectivas IL-2 e IL-2 en 7 tipos diferentes de células inmunitarias en PBMC humanas. Tanto IL2/N88R/C125S/D109C como IL2/N88R/C125S/D109C-PEG son altamente selectivos para Tregs en comparación con wt IL-2, y muestran mayor selectividad en múltiples tipos de células que IL-2.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención descrita en este documento es una nueva proteína de IL-2 con actividad agonista selectiva para las células T reguladoras y con una sustitución de aminoácidos adicionales que permiten la conjugación química con Polietilenglicol (PEG) que el aumento de la vida media circulante en comparación con agonista selectivo IL-2 solo. Las posiciones de aminoácidos sustituidos se seleccionaron en función de su exposición al disolvente dentro del complejo receptor de IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ y la capacidad predicha de las variantes conjugadas con polímero para retener la capacidad de unirse y activar el complejo receptor de IL2R $\alpha\beta\gamma$. Se construyeron una serie de variantes de IL-2 recombinante en las que se introdujeron residuos de aminoácidos de cisteína en las posiciones de aminoácidos seleccionadas y se analizaron las proteínas de otras variantes para determinar su actividad. Las variantes de IL-2 que se expresaron y purificaron con éxito se replegaron, se conjugaron con polímeros de maleimido-PEG y luego se analizaron para determinar la actividad agonista selectiva en las células T reguladoras. De este modo se ha identificado una variante agonista selectiva de IL-2, IL2/N88R/C125S/D109C. Esta nueva proteína y su conjugado con PEG aumentarán selectiva y eficientemente los niveles y la actividad de las células T reguladoras en pacientes, suprimirán la patología autoinmune y, por lo tanto, serán un agente terapéutico seguro y eficaz para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

La invención también proporciona proteínas variantes IL-2 que tienen al menos 95% a 98% y 100% de identidad de secuencia a la Seq. ID No. 1, que contiene la sustitución D109C y que tiene la capacidad de activar las células T. Las proteínas de esta invención pueden unirse a un resto de polietilenglicol unido a la cisteína en la posición 109. El resto de polietilenglicol tendrá opcionalmente un peso molecular de entre 5 y 40 kDa. La proteína variante de IL-2 de esta invención puede contener al menos una de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L y Q126F. Además, las proteínas variantes de IL-2 de esta invención pueden comprender opcionalmente la sustitución C125S. Más preferible es la proteína variante de IL-2 en la que la secuencia de la proteína IL-2 contiene la sustitución N88R y la sustitución C125S. Las proteínas de esta invención se proporcionan opcionalmente en una composición farmacéutica que comprende las proteínas de esta invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Introducción

Esta invención es una nueva proteína variante IL-2 que comprende una sustitución de aminoácidos que permite la conjugación química específica y eficiente de un polímero de PEG a la proteína variante de IL-2, mientras que se mantiene una alta afinidad para el receptor IL-2, de alta bioactividad, y una vida media en circulación extendida en comparación con la propia IL-2. Esta proteína variante se descubrió a través de un proceso en el que se identificaron las posiciones de los aminoácidos candidatos en la secuencia de IL-2 que se expusieron al solvente en la estructura cristalina del complejo receptor de IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ publicado, y se construyeron proteínas variantes en las que se sustituyeron residuos de cisteína en las posiciones seleccionadas. Estas variantes de IL-2 se expresaron y se purificaron, las proteínas variantes producidas en niveles suficientemente altos se conjugaron con PEG-maleimida, y luego se ensayó la bioactividad de IL2/N88R/D109C-PEG en células Treg y se demostró que estaban activas. La molécula definida por esta invención permitirá el tratamiento seguro y eficaz de las enfermedades autoinmunes mediante el nuevo mecanismo de estimulación de 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

Cuando se hace referencia a las variantes de una proteína de tipo salvaje, las referencias a sustituciones de aminoácidos tales como "D109C" se refieren al ácido aspártico residuo original (D) en la posición por el número (109), seguido de la cisteína de residuo sustituido (C).

"Al menos una secuencia de identidad de porcentaje (por ejemplo, 97%) a la Secuencia ID No. 1", como se usa aquí, se refiere a la medida en que la secuencia de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos es la misma. La identidad porcentual entre una secuencia de interés y una segunda secuencia en una ventana de evaluación, por ejemplo, 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 que está opuesta a un residuo idéntico que permite la introducción de espacios 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 caiga dentro de la ventana, y multiplicando 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 alineaciones y proporcionan el porcentaje de identidad entre secuencias de interés. El algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 22264-2268, 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 con huecos para fines de comparación, se utiliza Gapped BLAST 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 programas respectivos. Se puede usar una matriz PAM250 o BLOSUM62. El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Consulte el sitio web con la dirección URL de Internet de "ncbi.nlm.nih.gov" para estos programas. En la realización específica de las reivindicaciones, el porcentaje de identidad se calcula utilizando BLAST2 con los parámetros predeterminados que proporciona el NCBI.

Un "agonista selectivo IL-2" de esta invención es un agonista selectivo IL-2 $\alpha\beta\gamma$. Funcionalmente, activa selectivamente el complejo del receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$ en relación con el complejo del receptor IL2R $\beta\gamma$. Se deriva de una proteína de IL-2 de tipo salvaje definida estructuralmente que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la IL-2 de tipo salvaje de secuencia ID No. 1 y se define funcionalmente por la capacidad de activar preferentemente células Treg. La proteína también puede definirse funcionalmente por su capacidad de activar selectivamente la señalización del receptor de IL-2 en Treg, según lo medido por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en células Treg en comparación con CD4+ CD25-/células T bajas o células NK, o por la activación selectiva de células T estimuladas con fitohemaglutinina frente a células NK.

"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 inmunitarias 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 permeabilidad para la tinción, el fenotipo de la superficie celular CD4+CD25+CD127 se puede usar para definir Treg vivas. Las Treg también incluyen varias subclases de Treg, como las tTregs (derivadas del timo) y las pTregs (derivadas periféricamente, diferenciadas de las células T vírgenes en la periferia). Todas las Treg expresan el receptor de IL2R $\alpha\beta\gamma$, no producen su propia IL-2 y dependen de IL-2 para el crecimiento, y alguien experto en la técnica reconocerá que ambas clases serán activadas selectivamente por un agonista selectivo de IL2R $\alpha\beta\gamma$.

Un "PEG" es una molécula de poli(etilenglicol) que es un polímero soluble en agua de glicol de etileno. Las moléculas de PEG pueden conjugarse químicamente con proteínas para aumentar su vida media circulante. Los PEG pueden obtenerse en diferentes tamaños, y también pueden obtenerse comercialmente en formas activadas químicamente que se derivan con grupos químicamente reactivos para permitir la conjugación covalente a proteínas. Los PEG activados se pueden obtener de fuentes comerciales como NOF America (White Plains, NY) y Celares GmbH (Berlín, Alemania). Los PEG lineales se producen en varios pesos moleculares, tales como polímeros de PEG de pesos moleculares promedio en peso de 5.000 daltons, 10.000 daltons, 20.000 daltons, 30.000 daltons y 40.000 daltons. También se han desarrollado polímeros de PEG ramificados. Los polímeros PEG activados de uso común son aquellos derivados de los grupos N-hidroxisuccinimida (para la conjugación con aminas primarias, como los residuos de lisina y la proteína N-termini), con los grupos aldehído (para la conjugación a los extremos N), y los grupos maleimida o yodoacetamida (para acoplamiento a tioles tales como residuos de cisteína).

Un "IL-2-PEG conjugado" es una proteína de IL-2 a la que PEG se ha conjugado covalentemente. El resto de IL-2 puede ser IL-2 de tipo salvaje, IL-2 con una sustitución C125S, una de las proteínas anteriores con una sustitución en N88, D20 o Q126 que produce selectividad hacia el receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$, o una de las proteínas anteriores con una sustitución adicional que permite la conjugación específica del sitio de una molécula de PEG.

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

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

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE RESTOS IL-2 PARA LA CONJUGACIÓN DE PEG

Las siguientes consideraciones guían el diseño del resto IL-2 que cumpliría mejor los requisitos deseados.

(1) Los residuos de cisteína libres (no pareados) se diseñaron en IL-2 debido a la reactividad muy específica de los tioles con reactivos PEG activados con maleimida y yodoacetimida.

(2) Todas las construcciones se realizaron en el fondo de IL-2 humana de tipo salvaje con la sustitución C125S, para eliminar el único residuo de cisteína no pareado en IL-2, y la sustitución N88R, que reduce la afinidad por IL2RB y, por lo tanto, selectiva para IL2Rabg. C125 está directamente adyacente al Q126, un contacto importante con IL2RG.

(3) Se generaron sustituciones individuales adicionales de cisteína en sitios expuestos en la superficie en IL-2

para permitir una conjugación eficiente con PEG soluble en agua.

(4) Los sitios de conjugación con PEG también se eligieron de manera tal que se expusieron a un solvente dentro del complejo receptor de IL2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ (Wang, X., et al., 2005 Science. 310: 1159-63), y por lo tanto es poco probable que impidan la unión y activación del IL2R $\alpha\beta\gamma$.

(5) Las proteínas variantes deben expresarse bien y plegarse adecuadamente. La presencia de una nueva cisteína libre puede dar lugar a una formación inadecuada de disulfuro intramolecular y plegamiento incorrecto, o puentes disulfuro intermoleculares con otras moléculas que conducen a la agregación.

Métodos generales

En general, la preparación de las proteínas variantes de IL-2 de la invención puede llevarse a cabo por procedimientos descritos en la presente memoria y por técnicas de ADN recombinante reconocidas que implica, por ejemplo, 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 se pueden aislar y purificar usando agentes caotrópicos y electroforéticos bien conocidos, centrifugación y cromatografía. Ver en general, 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 la divulgación relacionada con estos métodos.

Los genes que codifican las proteínas variantes 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 modificaciones antes de la ligadura, y esto se puede lograr rellenando los salientes, eliminando las porciones terminales del fragmento con nucleasas (p. ej., ExoIII), mutagénesis dirigida al sitio o agregando nuevos pares de bases por PCR. Se pueden emplear poliligadores y adaptadores para facilitar la unión de fragmentos seleccionados. El constructo de expresión se ensambla típicamente en etapas que emplean rondas de restricción, ligadura y transformación de *E. coli*. Numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción del constructo de expresión son conocidos en la técnica (lambda.ZAP, Agilent; pET, EMD Millipore) y la elección particular no es crítica para la invención. La selección del vector de clonación se verá 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, el constructo resultante puede analizarse mediante restricción, secuencia de ADN, hibridación y análisis de PCR.

La mutagénesis dirigida al sitio se usa típicamente para introducir mutaciones específicas en los genes que codifican las proteínas variantes de IL-2 de esta invención por métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnology 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16. Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio se puede usar en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden usar para preparar las variantes de esta invención.

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 utilizar promotores de fuentes heterólogas siempre que sean funcionales en el host elegido.

Las proteínas IL-2 pueden expresarse en *E. coli* sin una secuencia de señal, y las proteínas se pueden recuperar de los cuerpos de inclusión y se pueden replegar en forma activa. Dicho sistema de expresión descrito en la patente de EE.UU. 7.105.653 B2.

Varias secuencias señal se pueden usar para facilitar la expresión de las proteínas descritas en este documento. La secuencia de señales se selecciona o diseña para una secreción eficiente y también se puede utilizar el procesamiento en la expresión huésped. La secuencia de señal de IL-2 humana nativa, la secuencia de señal que es homóloga a la secuencia de codificación de TCR, o la secuencia de señal que es homóloga a la secuencia de codificación de IL-2 de ratón puede usarse para células de mamíferos. Otros pares de células señal/secuencia de señal adecuados incluyen la secuencia señal de *B. subtilis* sacB para la secreción en *B. subtilis*, y el factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* o secuencias de señal phol de fosfatasa ácida *P. pastoris* para la secreción de *P. pastoris*. La secuencia de señal puede unirse directamente a través de la secuencia que codifica el sitio de escisión de la peptidasa de señal a la secuencia de codificación de la proteína, o a través de un puente de nucleótidos cortos.

Elementos para la mejora de la transcripción y traducción se han identificado para los sistemas de expresión de proteínas eucariotas. Por ejemplo, colocar el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 1000 bp a cada lado de un promotor heterólogo puede elevar los niveles transcripcionales de 10 a 400 veces en las células vegetales. El constructo de expresión también debe incluir las secuencias de iniciación de traducción

apropiadas. La modificación del constructo de expresión para incluir una secuencia de consenso de Kozak para la iniciación de la traducción adecuada puede aumentar el nivel de traducción en 10 veces.

Los casetes de expresión se unen a vectores apropiados compatibles con el huésped que se está empleando. El vector debe poder 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 el medio de cultivo. Las células huésped específicamente preferidas incluyen procariotas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas tales como células animales y cepas de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*. Las células de mamífero son generalmente preferidas, particularmente HEK, J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros huéspedes adecuados incluyen, por ejemplo, células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Ver Sambrook, supra. Entonces se pueden seleccionar líneas celulares estables transformadas o transfectadas. Los sistemas de transcripción-traducción *in vitro* también pueden emplearse como un sistema de expresión.

El ácido nucleico que codifica una proteína variante de IL-2 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 co-precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección, la electroporación, la microinyección, la transducción viral y/o la integración. Los métodos adecuados para transfectar células huésped se pueden encontrar en Sambrook et al. Supra, y otros libros de texto de laboratorio.

Alternativamente, se puede utilizar construcción de genes sintéticos para la totalidad o parte de la construcción de las proteínas descritas en este documento. Esto implica la síntesis *in vitro* de una molécula polinucleotídica diseñada para codificar una molécula polipeptídica de interés. La síntesis de genes se puede realizar utilizando varias técnicas, como la tecnología múltiplex basada en microchip 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 fotogramables.

Las proteínas variantes de IL-2 de esta invención se aíslan a partir de células huésped recolectadas 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 recolectadas. En particular, las técnicas de purificación se pueden usar para expresar y purificar una proteína variante de IL-2 deseada a gran escala (es decir, en cantidades de miligramos como mínimo) a partir de una variedad de enfoques que incluyen botellas de rodillos, matraces giratorios, placas de cultivo de tejido, biorreactor, o un fermentador.

Los sistemas de expresión de proteínas se han desarrollado que permiten la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas recombinantes (Kim, CH, et al. Curr Opin Chem Biol. 2013 S1367-5931 (13) 00071-9). Estos sistemas de expresión pueden incorporar aminoácidos no naturales que tienen reactividad química que permite la PEGilación de proteínas específicas del sitio en esas posiciones. Como alternativa al uso de residuos de cisteína libres, un experto en la técnica reconocerá que las posiciones de aminoácidos de IL-2 identificadas en este documento también podrían sustituirse con aminoácidos no naturales en lugar de cisteína para lograr objetivos similares de unión de PEG u otros polímeros no inmunogénicos para IL-2 con el fin de aumentar la vida media circulante.

Un experto en la técnica también reconocerá que el resto agonista selectivo de IL2 de esta invención también podría conjugarse con otros polímeros no inmunogénicos. Dos de estos polímeros son polímeros de aminoácidos recombinantes no inmunogénicos, tales como 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 (Schlapschy, M., et al., 2007, Protein Eng Des Sel. 20: 273-84).

EL RESTO DE AGONISTA SELECTIVO DE IL2

La IL-2 con la sustitución N88R es un caso ejemplar de un agonista selectivo de IL2 para el receptor IL2R α 2 γ (Shanafelt, AB, et al., 2000, Nat Biotechnol. 18: 1197-202). El IL2/N88R es deficiente en la unión a la subunidad del receptor IL2RB y al complejo del receptor IL2R β γ , pero puede unirse al complejo del receptor IL2R α 2 γ y estimular la proliferación de células T activadas por PHA que expresan IL2R tan eficazmente como la IL-2, mientras que exhiben una disminución de la capacidad 3.000 veces para estimular la proliferación de IL2R β γ expresando células NK, otros agonistas selectivos de IL2R α β γ 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 α β γ (Cassell, DJ, et al., 2002, Curr Pharm Des., 8: 2171-83). Un experto en la materia reconocerá que cualquiera de estas moléculas de agonista selectivo de IL2 puede sustituir al resto IL2/N88R con la expectativa de que una proteína de fusión Fc tendrá una actividad similar. Todas las mutaciones mencionadas anteriormente se pueden realizar en el fondo de *wt* IL-2, o *wt* IL-2 con los C125S de sustitución, que es una sustitución que promueve la estabilidad de IL-2 mediante la eliminación de un residuo de cisteína no apareado. Esta invención también se puede usar con otras mutaciones o

truncamientos que mejoran la producción o la estabilidad sin afectar significativamente la actividad de activación del receptor de IL-2.

Las variantes de esta invención incluyen opcionalmente variantes sustituidas de forma conservadora que se aplican tanto a secuencias de aminoácidos como a ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con una base mixta y/o residuos de desoxinosina (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka y otros, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y otros, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse 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 modificadas de manera conservadora. 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 metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para 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.

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

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).

Los ejemplos de sustituciones conservativas que se tolerarían en IL-2 incluyen Y, 31F, T51S, Q57N, E100D y T111S.

BIOENSAYOS

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 las Treg y medir los resultados y funciones terapéuticamente relevantes de las Treg activadas. Estos ensayos pueden usarse para medir la actividad terapéutica y la potencia de las moléculas de conjugado de IL2 PEG, y también pueden usarse para medir la farmacodinámica de un conjugado de IL2 PEG en animales o en humanos. Un ensayo mide la fosforilación de la proteína de transducción de señales STAT5, midió la citometría de flujo 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 constitutivamente activada 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, una persona experta en la técnica reconocerá que la medición de STAT5 fosforilada (pSTAT5) en células Treg refleja la activación de IL-2 en estas células, y será predictiva de otros resultados biológicos del tratamiento con IL-2 dado un tiempo de exposición apropiado y condiciones. Otro ensayo para la activación funcional mide la proliferación de células Treg estimuladas por IL-2. Alguien experto en la técnica 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 fenotipos marcadores CD4+CD25+FOXP3+ o CD4+CD25+CD127-, por el aumento de la expresión en células Treg de proteínas del ciclo celular asociadas a la proliferación, como el Ki-67, o por 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 Treg por IL-2 puede estabilizar los Treg y prevenir esta diferenciación (Chen, Q., et al., 2011, J Immunol, 186: 6329-37). Otro resultado de la estimulación de Treg por IL-2 es la estimulación del nivel de las moléculas efectoras funcionales de Treg, como CTLA4, GITR, LAG3, TIGIT, IL-10, CD39 y CD73, que contribuyen a la actividad inmunosupresora de Tregs.

FORMULACIÓN

Las composiciones farmacéuticas de las proteínas de fusión de la presente invención se definen como formuladas para uso parenteral (particularmente intravenosas o subcutáneas) de administración 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, tal 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 prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. Los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19ª ed., 1995.

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 pueden proporcionarse 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.

El conjugado de IL-2-PEG de la presente invención se puede incorporar en las composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas. Tales composiciones incluyen típicamente la proteína y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos suplementarios (p. ej., antibióticos) también pueden incorporarse en las composiciones.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. El conjugado de IL-2-PEG de la invención es probable que se administre por vía parenteral. Los ejemplos de vías de administración parenteral incluyen, por ejemplo, la administración 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 disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como fosfato de sodio mono- y/o di-básico, ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (p. ej., a un pH de aproximadamente 7,2-7,8, por ejemplo, 7,5). La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

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 vehículos 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 conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, 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 la dispersión se puede facilitar mediante el uso de

surfactantes, por ejemplo, polisorbato o Tween. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición.

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 se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, 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 deseado adicional de una solución del mismo filtrada previamente estéril.

En una realización, el conjugado de IL-2-PEG se prepara con vehículos que protegerán el conjugado IL-2-PEG contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulado. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Tales formulaciones pueden prepararse usando técnicas estándar.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

ADMINISTRACIÓN

Los conjugados de IL-2-PEG de la presente invención se administrarán preferiblemente por vía parenteral. La vía 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 depósitos. Para ciertas enfermedades se pueden utilizar vías de administración especializadas. Por ejemplo, para enfermedades oculares inflamatorias se puede usar 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 rango de 0,01 mcg/ml a 100 mcg/ml.

La determinación de la dosis está dentro del nivel de la experiencia ordinaria en la técnica. La dosificación es diaria o semanal durante el período de tratamiento, o puede realizarse en otra frecuencia intermitente. La administración intravenosa se realizará mediante inyección en bolo o infusión durante un período típico de una a varias horas. También se pueden emplear formulaciones de liberación sostenida. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado IL-2-PEG de la presente invención es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la afección tratada, tal como un cambio clínicamente significativo en las células Treg circulantes, un cambio clínicamente significativo en las células Treg se presentan dentro de un tejido enfermo, o un cambio clínicamente significativo en un síntoma de la enfermedad.

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

Como se define aquí, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de IL-2-PEG (es decir, una dosis efectiva) depende del polipéptido seleccionado y la frecuencia de la dosis. Por ejemplo, se pueden administrar cantidades de dosis únicas en el rango 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 al día a una o más veces por semana, o una o más veces al 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 efectivamente a un sujeto, incluyendo, entre otros, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los 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 eficaz del conjugado de PEG agonista selectivo de IL-2 de la invención es probable que sea una serie de tratamientos.

Enfermedades autoinmunes

Algunas de las enfermedades que pueden beneficiarse de la terapia de esta invención se han observado.

Sin embargo, el papel de las células Treg en las enfermedades autoinmunes es un área muy activa de investigación, y las enfermedades adicionales probablemente serán identificadas como tratables por esta invención.

Las enfermedades autoinmunes se definen como enfermedades humanas en las que el sistema inmune ataca sus proteínas propias, células y tejidos. Se puede encontrar una lista y revisión completa de las enfermedades autoinmunes en Las enfermedades autoinmunes (Rose y Mackay, 2014, Academic Press).

EJEMPLOS

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

1. Predicción de sitios de unión de PEG candidatos en IL-2

Para seleccionar los sitios candidatos para conjugar PEG a IL-2, los residuos de aminoácidos que están expuestos al disolvente y no parecen interferir directa o estéricamente con IL-2 que se une a la IL-2R $\alpha\beta\gamma$ fueron identificados. La estrategia se muestra esquemáticamente en la Figura 2, La inspección de la estructura cristalina publicada de IL-2 en complejo con los dominios extracelulares del receptor de IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (Wang, X., et al., 2005, Science 310: 1159-63 Stauber, DJ, et al., 2006, Proc Natl Acad Sci 103: 2788-93) identificaron los siguientes residuos: S6, K8, K48, K49, T51, E52, K54, K97, G98, F103, M104, E106, D109, y T133 (Figura 3). Los residuos de aminoácidos adicionales que no son visibles en la estructura cristalina, pero que, según la información sobre residuos vecinos, pueden cumplir los criterios, son A1, P2, T3, S4, S5, S99, E100, T101 y T102. Basados en esta lista de candidatos, se construyeron y produjeron 12 variantes (T3C, S6C, K8C, K48C, K49C, T51C, K97C, G98C, F103C, M104C, E106C y D109C) con sustituciones de cisteína en las posiciones indicadas (TABLA I).

2. Clonación, expresión y purificación de las proteínas variantes de agonistas selectivos de IL2 en *E. coli*.

Los ADNc que codifican proteínas con cada una de las sustituciones enumeradas en la Tabla 1 realizadas en el fondo de la IL-2 humana (SEQ ID NO: 1) que contiene las sustituciones N88R y C126S se prepararon mediante síntesis de ADN (Genescript, Piscataway, NJ), incorporando los sitios de restricción NCOI y BAM HI en los extremos 5' y 3', respectivamente, y clonados en pUC57. Las inserciones de ADNc se clonaron luego en el vector pET3d (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) utilizando los sitios NcoI y BAM H1. Las construcciones se transformaron en células BL21 (DE3) y se seleccionaron para la resistencia a la ampicilina. Las células transformadas se hicieron crecer en medio LB que contenía 50 ug/ml de ampicilina y 1% de glucosa a 37°C en cultivos de 0,5 L hasta un ABS280 de entre 0,6 y 1,0. Luego se añadió IPTG a 0,5 mM para inducir la expresión de proteínas, y los cultivos se recolectaron 3 horas después de la inducción.

Las células se sedimentaron por centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos. Los cuerpos de inclusión (IB) se extrajeron y purificaron a partir de sedimentos celulares utilizando Bugbuster (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se tomó una muestra para su análisis por SDS-PAGE. Los IB se disolvieron y se desnaturalizaron en clorhidrato de guanidina 8 M en 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) que contenía 2-mercaptoetanol al 0,1% (vol/vol) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las proteínas se replegaron luego por diálisis frente a 20 volúmenes de 10 mM Tris/HCL (pH 8,0)/1 mM EDTA durante 12 horas a temperatura ambiente. Luego, se añadió ácido trifluoroacético (TFA) a las muestras al 0,1%, las muestras se clarificaron por centrifugación para eliminar el precipitado, se filtraron a través de un filtro de 0,2 μ m y se purificaron mediante cromatografía de fase inversa. Las variantes de IL-2 se cargaron en una columna Vydac 208TP54 C-8 en TFA al 0,1% a un caudal de 1 ml/minuto y se eluyeron con un gradiente de 45 min de 0-75% de acetonitrilo en 0,1% de TFA. Las fracciones se seleccionaron mediante SDS-PAGE, con proteínas variantes de IL-2 que normalmente se eluyeron a aproximadamente 60% de acetonitrilo.

Los resultados de estos estudios de producción se resumen en la Tabla I. De los 12 variantes seleccionadas para la producción, sólo el 7 proporcionó picos de proteína IL-2 detectables después de la cromatografía de fase inversa. De estas 7 proteínas, 5 mostraron rendimientos muy bajos y produjeron material insuficiente para estudios adicionales a la escala realizada. De las 2 proteínas restantes, una, la variante D109C, que se produjo en el nivel más alto, fue PEGilada y ensayada. Estos resultados indican que la capacidad para producir estas proteínas variantes con residuos de cisteína no pareados varía ampliamente, y que muchos no pueden producirse fácilmente. Esto podría deberse a una variedad de factores, como la toxicidad de la proteína recombinante para el huésped de *E. coli*, la incapacidad de formar cuerpos de inclusión o la baja eficiencia del repliegamiento. La modificación del proceso de producción, o la expresión de las proteínas en otros sistemas de expresión, como en las células de mamíferos como una proteína secretada, podría mejorar la productividad de

algunas de las otras variantes. Sin embargo, en este sistema de expresión, la variante D109C se muestra claramente superior a los niveles de producción.

TABLA I. Resumen de la producción de proteínas variantes de IL-2 en *E. coli*.

Variante de agonista selectivo IL-2	Altura del pico, mAU (280 nM)
-	1
T3C	nd
S6C	nd
K8C	nd
K48C	1
K49C	11
T51C	nd
K97C	1
G98C	1
F103C	nd
M104C	2
E106C	nd
D109C	26

La altura del pico representa el rendimiento final relativo de la proteína variante en la cromatografía de fase inversa. nd = pico no detectado.

3. PEGilación de IL2/N88R/C125S/D109C.

Se conjugó IL2/N88R/C125S/D109C purificada a un PEG de 20 kDa para ensayar la bioactividad del conjugado. IL2/N88R/C125S/D109C se dializó en MES 0,1 M (pH 6,0), la concentración de proteína se determinó mediante OD280 utilizando un coeficiente de extinción de 0,65 (Abs 280 nM al 0,1%) y se hizo reaccionar con un exceso molar de 50 veces de maleimida-PEG (20.000 g/M; NOF America, White Plains, NY) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo L-cisteína a un exceso molar de 2 veces sobre maleimida-PEG. El análisis de 10 ug de la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE indicó una proteína IL-2 sin reaccionar residual no detectable.

4. Actividad de IL2/N88R/C125S/D109C PEGilada en células T.

La actividad de IL2/N88R/C125S/D109C PEGilada en las células T se determinó mediante la medición de la estimulación de los niveles de fosfo-STAT5 (pSTAT5) en subconjuntos de células T CD4+. La activación del receptor de IL-2, a través de la unión de IL-2 a un heterodímero de IL2RB e IL2RG, promueve la interacción de las proteínas JAK1 y JAK3 con los dominios citoplásmicos IL2RB e IL2RG, respectivamente, estimulando la fosforilación de la proteína STAT5 (pSTAT5) que luego transduce la señal de IL-2 al núcleo. STAT5 es necesario para el desarrollo de células Treg, y la activación artificial de STAT5 en células T CD4+ es suficiente para la producción de células Treg en ausencia de IL-2 (Mahmud, SA, et al., 2013, JAKSTAT 2: e23154). Los niveles de pSTAT5 se midieron con un anticuerpo para un péptido STAT5 fosforilado por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en células permeabilizadas. Las células Treg expresan de forma constitutiva CD25, y las células que están en la parte superior del 1% de los niveles de expresión de CD25 están altamente enriquecidos 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 FACS se clasificaron en grupos CD25^{alto} (el 1-2% superior de las células que expresan CD25) y CD25^{bajo}.

PBMC humanas criopreservadas (Astarte Biologics, Seattle, WA) se descongelaron, se lavaron en medios X-VIVO 15 (Lonza, Allendale, NJ) que contienen 1% de suero humano AB (Mediatech, Manassas, VA) y se dejaron recuperar durante 2 horas a 37°C. Las células se distribuyeron luego en 0,1 ml en tubos de 15x75 mm a una concentración de 5 x 10⁶ células/ml. Las células se trataron con 4 nM IL-2, 40 nM PEG-IL2/N88R/D109C o IL2/N88R/D109C, o una cantidad equivalente de maleimido-PEG reaccionó con L-cisteína durante 10 minutos a 37°C, y luego se fijó con tampón de fijación Cytofix a 37°C durante 10 minutos. Las células fijas se permeabilizaron con Perm Buffer III (BD Biosciences, Santa Clara, CA) durante 30 minutos en hielo, se lavaron y luego se tiñeron con una mezcla de anti-CD4-Pacífico Azul (BD Biosciences, Santa Clara, CA), anticuerpos CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) y anti-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) durante 30 minutos a 20°C, lavados y analizados por FACS en un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences).

Los resultados de este experimento indicaron que tanto IL2/N88R/C125S/D109C como IL2/N88R/C125S/D109C-PEG activaron selectivamente una pequeña subpoblación de células CD4+CD25^{altas} enriquecidas para células Treg en comparación con IL2 (figura 2). IL-2 activó más del 80% de las células T CD4+ a IL-2 4 nM, con una alta proporción de células activadas que expresan niveles bajos de CD25 o ninguno. Estos resultados indican que la IL2/N88R/C125S/D109C PEGilada conserva la capacidad selectiva para activar las Treg.

5. Selectividad de la proteína conjugada agonista-PEG selectiva IL2 en PBMC humanas

Para determinar la selectividad de IL2/N88R/C125S/D109C-PEG en un contexto biológico más amplio, se desarrolló un ensayo para medir la activación de STAT5 en todos los tipos de células inmunes clave en crudo PBMC humana no fraccionada. Se aislaron PBMC humanas mediante centrifugación Ficoll-Hypaque de un voluntario normal. Se suspendieron 10^6 PBMC en medio X-VIVO15 con glucosa (Lonza) y FBS al 10% (Omega), y se trataron con proteínas de prueba 10^{-8} M durante 20 min a 37° C. Las células se trataron luego con Foxp3/factor de tinción de factor de transcripción (EBIO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células luego se fijaron con tampón Cytofix y se permeabilizaron con Perm Buffer III como se describe en el Ejemplo 3. Las células fijas y permeabilizadas se lavaron luego con FBS al 1% y se tiñeron con mezcla de anticuerpos durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células teñidas se lavaron luego en FBS al 1%/PBS, 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-pSTAT5-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 de células inmunitarias clave.

Fenotipos celulares se definen del siguiente modo: las células Treg: CD3+, CD4+, Foxp3+, CD25^{altas}, CD8-, CD56-; células Teff activadas por CD4: 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-.

Las proteínas se ensayaron en este ensayo a una concentración de 10^{-8} M. Los resultados, mostrados en la Figura 5, muestran que tanto la IL-2/N88R/C125S/D109C como IL2/N88R/C125S/D109C-PEG exhiben notable selectividad en comparación a wt IL2, que activó pSTAT5 en grandes fracciones de todas las poblaciones celulares. IL2/N88R/C125S/D109C-PEG estimuló la señal pSTAT5 en la población Treg en esencialmente el mismo nivel que el de IL-2 wt. Un análisis adicional (no mostrado) mostró que las células pSTAT5 + NK tenían un alto contenido de CD25, que es característico de las células brillantes NK-CD56, una subpoblación de células NK que también tiene actividad inmunoreguladora (Poli, A, et al., 2009 Immunology. 126 (4): 458-65). Estos resultados demuestran la actividad y la alta selectividad de IL2/N88R/C125S/D109C-PEG para Tregs en un medio biológico complejo.

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> SEQ ID NO 1

<211> LONGITUD: 133

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Homo sapiens

<400> SECUENCIA: 1

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

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

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

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

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

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

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

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

30 Ile Ser Thr Leu Thr
130

35 <110> Delinia, Inc. Greve, Jeffrey

<120> VARIANTES DE IL-2 MODIFICADAS QUE ACTIVAN SELECTIVAMENTE LAS CÉLULAS T REGULATORIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES DE LA AUTOINFUNCIÓN

40 <130> 98210-950525

<140> WO PCT/US2015/044462

<141> 2015-08-10

45 <150> US 62/070,016

<151> 2014-08-11

<160> 2

50 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

45 <210> 2
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> polinucleótido de IL-2 variante sintética

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3). (3)
 <223> Xaa es Thr o Cys

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6). (6)
 <223> Xaa es Ser o Cys

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8). (8)
 <223> Xaa es Lys o Cys

5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20). (20)
 <223> Xaa es Asp o His
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31). (31)
 <223> Xaa es Tyr o Phe
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (48). (48)
 <223> Xaa es Lys o Cys
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49). (49)
 <223> Xaa es Lys o Cys
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51). (51)
 <223> Xaa es Thr, Cyn o Ser
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57). (57)
 <223> Xaa es Gln o Asn
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88). (88)
 <223> Xaa es Asn, Arg, Ile o Gly
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97). (97)
 <223> Xaa es Lys o Cys
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98). (98)
 <223> Xaa es Gly o Cys
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100). (100)
 <223> Xaa es Glu o Asp
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103). (103)
 <223> Xaa es Phe o Cys
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104). (104)
 <223> Xaa es Met o Cys
 65
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106). (106)
 <223> Xaa es Glu y Cys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (109). (109)
 <223> Xaa es Asp o Cys
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (111). (111)
 <223> Xaa es Thr o Ser
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (125). (125)
 <223> Xaa es Cys o Ser
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (126). (126)
 <223> Xaa es Gln, Leu o Phe
 20
 <400> 2

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

 30 Leu Leu Leu Xaa Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Xaa Lys
 20 25 30

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

 40 Xaa Ala Xaa Glu Leu Lys His Leu Xaa Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

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

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

 55 Xaa Xaa Ser Xaa Thr Thr Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Ala Xaa Glu Xaa Ala
 100 105 110

 60 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Xaa Ser Ile
 115 120 125

 60 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica formulada para administración parenteral, que comprende una proteína variante de IL-2 que tiene por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y que contiene la sustitución D109C con respecto a la SEQ ID NO: 1.
- 10 **2.** La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la proteína variante de IL-2 es un agonista selectivo de IL-2.
- 15 **3.** La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la proteína variante de IL-2 es un agonista selectivo de IL-2R $\alpha\beta\gamma$.
- 20 **4.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína variante de IL-2 contiene por lo menos una sustitución adicional seleccionada del grupo que consiste de: C125S, N88R, N88I, N88G, D20H, Q126L y Q126F, con respecto a la SEQ ID NO: 1.
- 25 **5.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de la proteína IL-2 contiene la sustitución N88R y la sustitución C125S con respecto a la SEQ ID NO: 1.
- 30 **6.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína variante de IL-2 tiene un resto de polietilenglicol enlazado a la cisteína en la posición 109 en donde el resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de entre 5 y 40 kDa.
- 35 **7.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína variante de IL-2 tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 98% con la SEQ ID NO: 1.
- 40 **8.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 9.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método para estimular las concentraciones de células T reguladoras humanas, en donde dicho método comprende administrar dicha composición farmacéutica a una dosis terapéuticamente eficaz suficiente para estimular las concentraciones de células T reguladoras humanas.
- 10.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 11.** La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste de: diabetes tipo 1, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de injerto contra huésped.

FIGURA 1

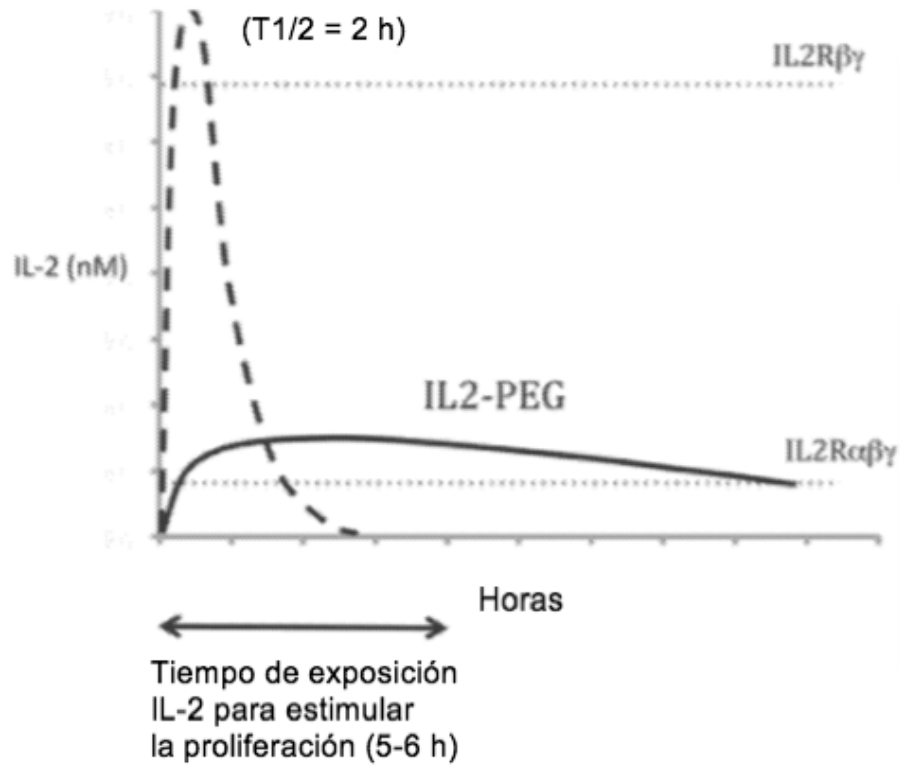


FIGURA 2

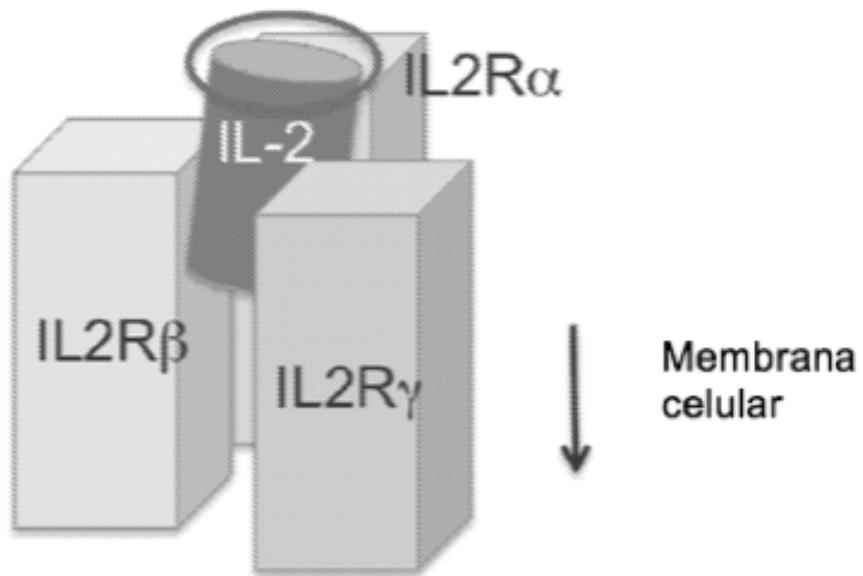


FIGURA 3

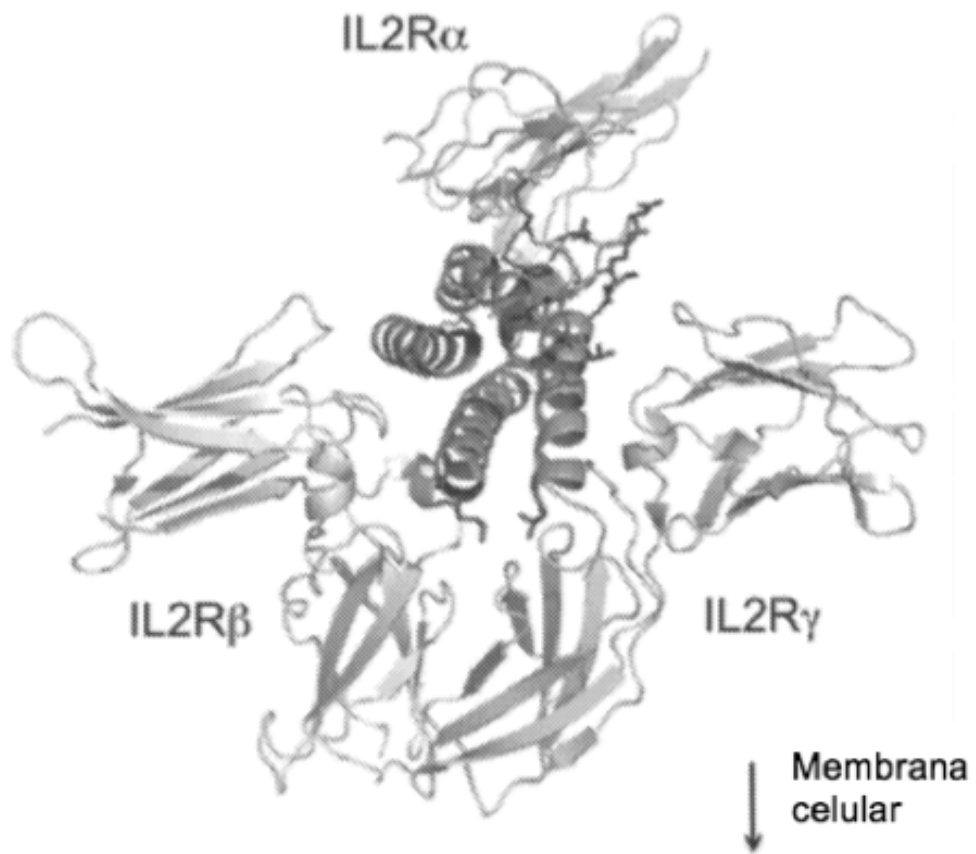


FIGURA 4

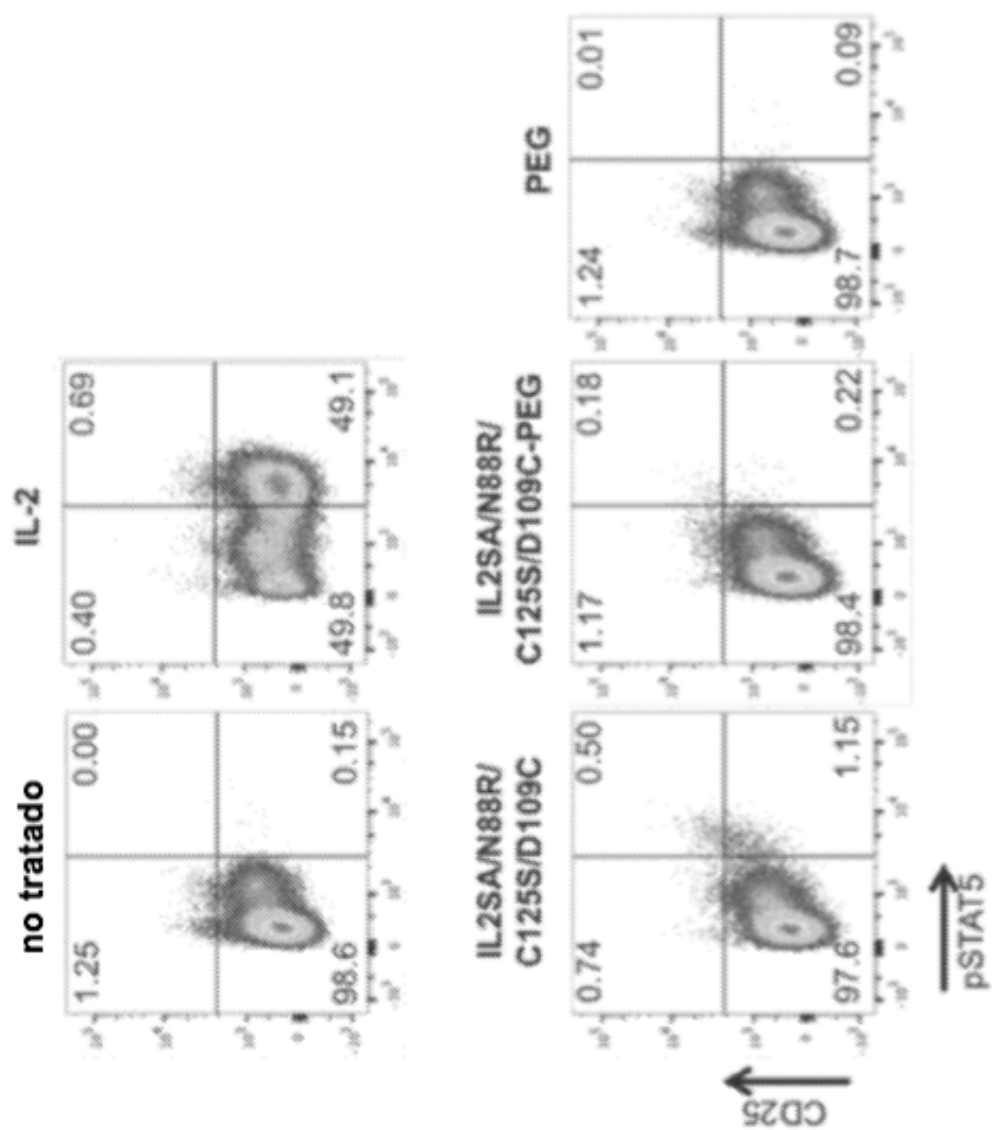


FIGURA 5

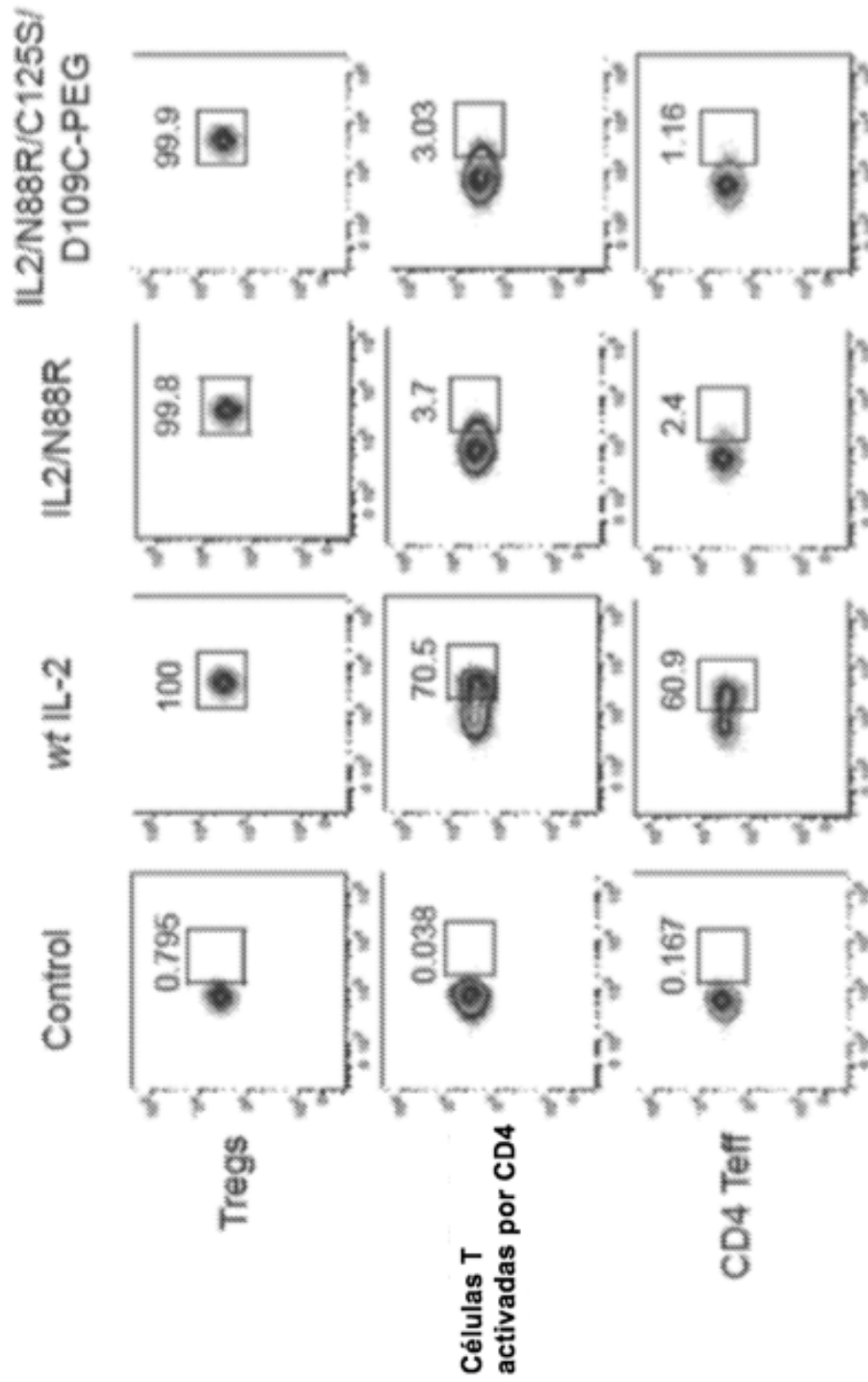


FIGURA 5 (cont)

