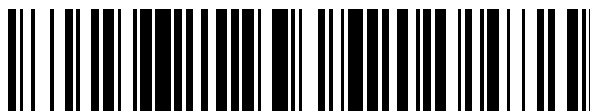


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 732**

51 Int. Cl.:
C12N 15/24 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06795556 .7**
96 Fecha de presentación: **19.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1904635**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **IL-7 glicosilada, su preparación y sus usos**

30 Prioridad:
20.07.2005 EP 05291556

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2012

73 Titular/es:
CYTHERIS
175, AVENUE JEAN-JACQUES ROUSSEAU
92130 ISSY LES MOULINEAUX, FR

72 Inventor/es:
MORRE, Michel;
ASSOULINE, Brigitte;
RANCE, Iann;
GREGOIRE, Anne y
BREQUE, Corinne

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 379 732 T3

DESCRIPCIÓN

IL-7 glicosilada, su preparación y sus usos

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos de interleuquina-7 mejorados, así como a composiciones que los comprenden, a su preparación y a sus usos. La invención se refiere, más en concreto, a polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados que tienen propiedades mejoradas, así como a su fabricación y a sus usos terapéuticos. En la presente se describen nuevos polipéptidos de IL-7 que tienen secuencias de aminoácidos modificadas que contienen un sitio o sitios de glicosilación creados artificialmente, así como las correspondientes moléculas de ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes u hospedantes recombinantes. También se describe el uso de dichos polipéptidos, células o ácidos nucleicos para el tratamiento curativo o preventivo de sujetos mamíferos, incluyendo sujetos humanos.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos B y T son las principales células efectoras de las respuestas inmunológicas. Ambas clases celulares se considera que derivan en último término de células pluripotenciales hematopoyéticas en la médula ósea de mamíferos, a través de células progenitoras o precursoras que representan etapas distinguibles en la diferenciación de cada clase. Las células T maduras se desarrollan principalmente en el timo, supuestamente a partir de una célula precursora que migra desde la médula ósea hacia el timo en una etapa temprana del desarrollo de los linfocitos T. El desarrollo de células linfoides depende de factores del crecimiento, de supervivencia y de diferenciación producidos por diversas células estromáticas. Existe una serie de factores que están activos en las células T y B periféricas maduras, incluyendo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, interferón-gamma, BSF-2, neuroleuquina, factor del crecimiento transformante-beta e IL-7.

La "interleuquina-7" o "IL-7" se refiere a una glicoproteína secretora endógena de mamífero que es capaz de inducir la proliferación de progenitores y precursores de linfocitos derivados de la médula ósea, incluyendo los precursores especializados conocidos como células pre-B. Derivada originariamente del elemento estromático de una línea de células de la médula ósea, la IL-7 también es segregada por células estromáticas tímicas, células intestinales y otras células epiteliales, algunas células dendríticas y células dendríticas foliculares, queratinocitos y, en general, todos los tejidos linfoides. Otras denominaciones de esta molécula son "factor del crecimiento de células pre-B" y "linfopoyetina-1".

El documento EP 0314415 (o el documento US 4.965.195) describe proteínas de interleuquina-7 de mamífero y los correspondientes ADN. La secuencia de aminoácidos de la IL-7 humana contiene tres sitios de glicosilación N-enlazados putativos, localizados en los restos Asn en las posiciones 70, 91 y 116. La expresión recombinante transitoria de hIL-7 (IL-7 humana) en células COS permite la visualización de r-huIL-7 (IL-7 humana recombinante) como tres bandas de proteínas con un peso molecular aparente de aproximadamente 20, 24 y 28 kDa (Cosman *et al.*, Lymphokine Receptor Interactions, 1989, 179:229-236). También se ha indicado la expresión recombinante estable de hIL-7 en células BHK (Armitage *et al.*, The Journal of Immunology, 1990, 144:938-941). Sin embargo, el estado de glicosilación de la IL-7 humana natural, en particular el estado de O-glicosilación, nunca se ha documentado ni estudiado, y el impacto del perfil de glicosilación sobre las propiedades de IL-7 nunca se ha considerado. Además, la IL-7 humana madura no glicosilada (r-hIL-7) producida en *E. coli*, según se describe en el documento EP 0314415, muestra un peso molecular de 17.387 Daltons y una alta actividad *in vitro* en bioensayos específicos basados en la proliferación de diversas poblaciones de linfocitos. Otras citoquinas y factores del crecimiento, tales como G-CSF, GM-CSF, IFN, HGF, etc., también muestran una actividad terapéutica completa sin glicosilación.

El documento WO 2004/018681 describe un confórmero activo de la IL-7 humana, que comprende los siguientes puentes disulfuro: 1-4 (C2-C92), 2-5 (C34-C129), y 3-6 (C47-C141), así como métodos para su producción o su caracterización y sus usos.

La IL-7 se describió originariamente como una citoquina cuya principal actividad era la inducción de la proliferación de células B precursoras (Namen, A.E., *et al.*, Journal of Experimental Medicine, 1988, 167:988-1002). La IL-7 se ha descrito en fechas más recientes como implicada en la supervivencia y la proliferación de timocitos (células T) durante la etapa temprana del desarrollo de células T (Schluns, K.S., *et al.*, Nature Immunology, 200, 1(5):426-432). La vía de la IL-7 es fundamental para el desarrollo de linfocitos, especialmente sobre los timocitos en desarrollo (Maeurer, M.J., *et al.*, Int. Rev. Immunol., 1988, 16:309-322; Fry, T.J., *et al.*, Blood, 2002, 99:3892-3904). Fry y colaboradores también identificaron a la IL-7 como un potente modulador de la regeneración de células T independiente del timo en una acción multifactorial (Fry, T.J., *et al.*, Blood, 2001, 97(6):1525-1533). La IL-7 modula potentemente a las células T maduras, y además de este efecto sobre las células T maduras, la IL-7 puede influir en el desarrollo de las células presentadoras de antígenos (Márquez, C., *et al.*, J. Exp. Med., 1995, 181:475-483). La IL-7 es fundamental para la regeneración de las células T de memoria, en ambos subconjuntos CD4+ y CD8+ (Kondrack, R.M., *et al.*, J. Exp. Med., 2003, 198:1797-1806; Kaech, S.M., *et al.*, Nat. Immunol, 2003, 4:1191-1198).

Por tanto, la IL-7 tiene un gran potencial terapéutico para su uso en la estimulación de la proliferación de precursores de las células T, de células B secretoras de anticuerpos, en la estimulación de la expansión periférica de células T

dirigida por antígenos, y en la producción de células T no estimuladas, así como otros tipos de células hematopoyéticas. Un uso terapéutico particularmente interesante de las moléculas de IL-7 activas es para la reconstitución inmunológica de pacientes linfopénicos: pacientes tratados de un cáncer, pacientes que han recibido una transferencia de médula ósea o de células pluripotenciales, pacientes que presentan una inmunodeficiencia genética o adquirida, pacientes ancianos o cualquier paciente que tenga un recuento bajo de CD4. Otras utilidades residen en la capacidad de la IL-7 para producir nuevas células T CD4 no estimuladas, o para expandir agrupaciones específicas, para producir o aumentar las respuestas inmunológicas específicas (potenciación de vacunas).

En vista de sus potenciales terapéuticos, existe un considerable interés en el desarrollo de polipéptidos de IL-7 mejorados o biológicamente activos que sean adecuados para unos usos terapéuticos eficaces. A este respecto, entre las diversas citoquinas y factores del crecimiento disponibles en el mercado, algunos son muy poco inmunogénicos (por ejemplo, el interferón-alfa "IFN α ", el factor estimulante de colonias de granulocitos "G-CSF"), de forma que las correspondientes sustancias farmacológicas no requieren una pureza polipeptídica muy específica aparte del nivel convencional normalmente aceptado para las proteínas recombinantes. En contraste, otros factores del crecimiento son más inmunogénicos (por ejemplo, el beta-interferón " β -IFN", el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos "GM-CSF"), o su actividad específica es tan crítica para la vida (por ejemplo, la eritropoyetina "EPO") que el perfil y la pureza polipeptídica de la sustancia farmacológica debe estudiarse de modo específico y mantenerse dentro de unos límites estrechos para protegerlas de la inmunogenicidad.

La IL-7 es una molécula excepcional. Debido sus propiedades inmunopotenciadoras intrínsecas, la IL-7 utilizada como agente terapéutico es particularmente propensa a activar una inmunogenicidad anti-IL-7 (anticuerpos anti-IL-7 neutralizantes o de unión a IL-7). Esta inmunogenicidad es perjudicial para la actividad terapéutica a largo plazo de la proteína. Los anticuerpos anti-IL-7 pueden modificar la farmacocinética de la IL-7 y neutralizar su actividad terapéutica.

Diversas isoformas de IL-7 están implicadas en la activación de la inmunogenicidad anti-IL-7, entre las cuales se encuentran secuencias polipeptídicas alteradas (por ejemplo, formas oxidadas, reducidas, desamidadas o truncadas), múltmeros de IL-7 covalentes o no covalentes, tales como moléculas de IL-7 agregadas, y similares. Por tanto, resulta fundamental definir polipéptidos y sustancias farmacológicas de IL-7 que sean más estables, menos propensas a la agregación intermolecular, menos inmunogénicas y aún biológicamente activas. En efecto, aunque la actividad de la mayoría de los fármacos se correlaciona con el parámetro de AUC ("Area Under Curve", área bajo la curva), la actividad de la IL-7 se correlaciona con el parámetro de la semivida y, más en concreto, con el tiempo medio de residencia.

Sumario de la invención

La presente invención describe nuevos polipéptidos de IL-7 mejorados, sustancias farmacológicas y composiciones. Más en concreto, la invención describe nuevas especies moleculares de IL-7 que tienen un alto grado de glicosilación y un perfil de oligosacáridos desplazado hacia un tamaño molecular mayor con más sialilación y fucosilación de los restos carbohidrato y un menor punto isoeléctrico. La invención demuestra que estos nuevos perfiles de oligosacáridos confieren una mejor estabilidad química y farmacéutica a estas nuevas sustancias farmacológicas, y un perfil farmacocinético prolongado después de la administración *in vivo*, que se caracteriza por un mayor tiempo medio de residencia (MRT, "Mean Residence Time"), lo cual permite una programa de dosificación menos frecuente.

Por tanto, la presente invención proporciona nuevos polipéptidos de IL-7 muy glicosilados o hiperglicosilados que tienen mejores propiedades. Se describen polipéptidos de IL-7 que tienen secuencias de aminoácidos modificadas que contienen un sitio o sitios de glicosilación creados artificialmente, así como las correspondientes moléculas de ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes u hospedantes recombinantes. También se describe el uso de dichos polipéptidos, células o ácidos nucleicos para un tratamiento curativo o preventivo de sujetos mamíferos, incluyendo sujetos humanos. Por tanto, la presente invención describe nuevos polipéptidos de IL-7 activos, sustancias farmacológicas y composiciones farmacéuticas que muestran una mayor estabilidad, una menor susceptibilidad a la proteólisis y a la agregación, una actividad a largo plazo *in vivo* ventajosa y una menor inmunogenicidad, permitiendo con ello que se generen unas respuestas inmunológicas globales o específicas mejoradas en sujetos mamíferos.

Un objeto de esta invención reside en una composición de IL-7 hiperglicosilada.

Otro objeto de esta invención reside en un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado purificado.

Este polipéptido de IL-7 hiperglicosilado contiene al menos tres restos aminoácidos N-glicosilados.

Otro objeto de esta invención se refiere al uso de la IL-7 hiperglicosilada para la fabricación de un medicamento que consiste en dicha IL-7 hiperglicosilada y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para tratar un sujeto mamífero.

Otro objeto de esta invención se refiere al uso de una composición de IL-7 hiperglicosilada para la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto mamífero.

También se describe un método para provocar o estimular una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de IL-7 hiperglicosilada.

- 5 También se describe un método para potenciar la expansión *ex vivo* de células T, comprendiendo dicho método poner en contacto a células T con una composición o un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado, potenciando con ello la expansión de las células T.

10 En una realización concreta, la composición de IL-7 hiperglicosilada es una composición que comprende al menos 80%, preferiblemente entre 80% y 95% de polipéptidos de IL-7 que están glicosilados en al menos tres restos aminoácidos diferenciados. Estos restos pueden estar presentes en la naturaleza dentro de una secuencia de un polipéptido de IL-7 y/o en un sitio o sitios de glicosilación creados artificialmente.

15 En otra realización concreta, la composición de IL-7 hiperglicosilada es una composición que comprende al menos 80%, preferiblemente entre 80% y 95% de polipéptidos de IL-7 que están glicosilados en tres a ocho restos aminoácidos diferenciados, incluyendo un sitio de O-glicosilación y hasta siete sitios de N-glicosilación. Estos restos pueden estar presentes en la naturaleza dentro de una secuencia de un polipéptido de IL-7 y/o en un sitio o sitios de N-glicosilación creados artificialmente.

20 A este respecto, otro objeto de esta invención se refiere a polipéptidos de IL-7 que tienen una secuencia de aminoácidos modificada, en los que dicha secuencia comprende al menos un sitio de glicosilación creado artificialmente. Según realizaciones concretas, los polipéptidos de IL-7 de esta invención comprenden 1, 2, 3 ó 4 sitios de glicosilación creados artificialmente, más preferiblemente 1, 2 ó 3, y aún más preferiblemente 1 ó 2. Tal como se describirá a continuación, los sitios de glicosilación creados artificialmente son preferiblemente sitios de glicosilación N-enlazados. Los polipéptidos de IL-7 de esta invención pueden tener cualquier origen de mamífero, en particular ser de origen humano. Además, estos polipéptidos de IL-7 pueden comprender la secuencia de un polipéptido de IL-7 maduro, o comprender además restos aminoácidos adicionales, tales como un péptido de secreción, por ejemplo. Además, o como alternativa, el polipéptido de IL-7 es preferiblemente un conformero específico que comprende los siguientes tres puentes disulfuro: Cys: 1-4 (Cys2-Cys92); 2-5 (Cys34-Cys129); 3-6 (Cys47-Cys141). Los ejemplos específicos de dichos polipéptidos de IL-7 modificados comprenden al menos una modificación de un aminoácido, según se describe en la tabla 1 a continuación, o sus combinaciones.

30 También se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-7 según se analizó anteriormente. La molécula de ácido nucleico puede ser cualquier molécula de ADN o ARN, generalmente una molécula de ADNc.

Se describe una molécula de ácido nucleico que codifica una señal de secreción que comprende SEQ ID NO:19.

35 Se describe un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente. El vector puede ser cualquier vector procariota o eucariota, generalmente un vector eucariota, y puede seleccionarse de un plásmido, ADN episómico, un cósmido, un vector vírico, un cromosoma artificial, etc. El vector puede comprender cualquier secuencia reguladora que permita la expresión apropiada del ácido nucleico codificador en una célula hospedante seleccionada, por ejemplo, un promotor, un terminador, una poliA, un origen de la replicación, una región homóloga, un intrón, genes de regiones no traducidas 5' o 3' (UTR), etc.

40 Los anteriores ácidos nucleicos y vectores pueden utilizarse, por ejemplo, para producir polipéptidos de IL-7 de mamífero recombinantes en diversas células hospedantes competentes, así como para objetivos de terapia génica.

45 También se describe una célula hospedante recombinante que comprende un ácido nucleico o un vector según se describió anteriormente. Esta célula recombinante puede ser procariota o, más preferiblemente, eucariota, tal como una célula de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero, por ejemplo, más preferiblemente una célula hospedante recombinante transducida para que exprese o sobreexpresen un gen de glicosiltransferasa y/o de 2,6-sialiltransferasa, por ejemplo de origen humano.

Se describe una sustancia farmacológica que comprende un polipéptido de IL-7 según se describió anteriormente, generalmente un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado. Más preferiblemente, la sustancia farmacológica contiene menos de aproximadamente 10% de polipéptidos de IL-7 no glicosilados o monoglicosilados y/o está exenta fundamentalmente de impurezas relacionadas con el producto.

50 Se describe el uso de una sustancia farmacológica según se describió anteriormente, para la fabricación de un medicamento ("producto farmacológico") o una composición farmacéutica.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de IL-7 o una composición o una sustancia farmacológica según se describió anteriormente, y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente compatibles.

Otro aspecto de esta invención es un método para producir un polipéptido de IL-7 tal como se describió anteriormente, a partir de células hospedantes procariotas o eucariotas, así como un método para detectar o medir la presencia de dicho polipéptido de IL-7 en una muestra, o para caracterizar una muestra.

En un aspecto concreto, el método para producir un polipéptido de IL-7, según se definió anteriormente, comprende:

- 5 a) cultivar una célula hospedante recombinante según se definió anteriormente, y
- b) recoger el polipéptido de IL-7 producido a partir de dicha célula.

Según una realización preferida, la expresión se realiza bajo condiciones que permitan añadir motivos de glicosilación eficaces al polipéptido de IL-7, en particular restos ácido siálico.

- 10 En otra realización preferida, la producción se realiza en un modo de alimentación discontinua o por perfusión, que mantiene a las células al final de la fase de crecimiento exponencial. Estas condiciones aumentan la calidad de las modificaciones postraduccionales y contribuyen a un grado mayor de sialilación por polipéptido de IL-7. Según realizaciones concretas, el ácido nucleico codificador comprende una señal de secreción y/o una secuencia de ácido nucleico optimizada y/o la célula hospedante es una célula hospedante eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero, de insecto o de levadura).

- 15 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un polipéptido de IL-7 o una composición de IL-7 hiperglicosilada, según se definió anteriormente u obtenidos mediante un método según se describió anteriormente, para la fabricación de una composición farmacéutica para provocar o modular una respuesta inmunológica en un sujeto, en particular para inducir una estimulación de la linfopoyesis prolongada y/o para amplificar una respuesta inmunológica.

- 20 La invención también se refiere al uso de un polipéptido de IL-7 según se definió anteriormente, u obtenido mediante un método según se describió anteriormente, para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada con una inmunodeficiencia.

- 25 Tal como se analizará a continuación, los polipéptidos de esta invención muestran una semivida plasmática y un tiempo medio de residencia extendidos, que favorecen la actividad y la interacción de los receptores *in vivo* y/o una mejor estabilidad y/o una menor inmunogenicidad a largo plazo, permitiendo con ello su uso para tratar una diversidad de trastornos patológicos en sujetos mamíferos, en particular en sujetos humanos.

Leyendas de las figuras

- 30 Figura 1: Plásmido ph-pgk.EP7-hIL-7: **ef1a pA**: secuencia de poliA del "factor de alargamiento 1-alfa"; **hgh pA**: secuencia de poliA de la "hormona del crecimiento humana"; **SpA**: secuencia de poliA sintética; **hph**: resistencia a la higromicina; **Amp**: resistencia a la ampicilina; **MAR β-globina de conejo**: "región de unión a la matriz" de la β-globina de conejo putativa; **pr. tk**: promotor de la timidina quinasa; **pot. sv40**: potenciador de sv40; **pr pgk**: promotor de fosfoglicerato quinasa; **5'UTRint1**: región no traducida 5' que comprende un intrón quimérico (hBglobina-inmunoglobulina); **EP7-hIL7**: ADNc de la IL-7 humana optimizado cadena arriba del péptido señal EP7.

Figura 2: Plásmido pBh-pgk.EP7-hIL7: **Bcl2**: ADNc de Bcl2; **IRES**: sitio de entrada a ribosomas interno.

- 35 Figura 3: Expresión de hIL-7 recombinante en células de mamífero cultivadas en un biorreactor desde el día 1 (D1) al día 10 (D10), transferencia Western de IL-7 intracelular frente a segregada.

- 40 Figura 4: Fraccionamiento cromatográfico de las glicoformas de rec-hIL-7 a través del proceso de purificación: análisis de SDS-PAGE del contenido en proteínas de las diferentes fracciones de elución (B1-B10). Las glicoformas de IL-7 se separan durante las etapas de captura y HIC. Se emplearon gradientes de tampón para eluir de manera diferenciada las glicoformas de IL-7 según sus propiedades fisicoquímicas ligeramente diferentes. El fraccionamiento y la posterior selección de la fracción adecuada permite el enriquecimiento de las tres hIL-7 recombinantes totalmente glicosiladas (3 N- o 2 N-asociadas con un resto 1O-azúcar). MPM, marcadores de peso molecular de las proteínas (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa); B1-B10, fracciones de elución; B1-B4, fracciones de elución retenidas para su posterior purificación; CT, fracción B1 obtenida a partir del cultivo de una línea celular HEK293 transfectada con el mismo ADNc de hIL-7 optimizado.

Figura 5: Análisis de la hIL-7 recombinante purificada en SDS-PAGE. Las muestras de la hIL-7 recombinante purificada se cargaron en un SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Los geles se revelaron mediante:

A. tinción de Coomassie

B. transferencia Western

- 50 MPM, marcadores de peso molecular (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa). Carril 1: HG-37-147; Carril 2: HG-40-104; Carril 3: HG-hIL-7; Carril 4: hIL-7 de *E. coli*.

Figura 6: SDS-PAGE comparativo del peso molecular aparente de productos de rec-hIL-7 glicosilados purificados. Carril M = marcador de peso molecular, Carril 1 = representación esquemática del producto purificado según se describe en Namen *et al.*, en la patente n° US 5.328.988 (aproximadamente 25 kDa), Carril 2 = producto de rec-sIL-7 de CHO purificado por el solicitante, Carril 3 = producto de rec-sIL-7 de CHO purificado por el solicitante, Carril 4 = glicofomas 1N y 2N de hIL-7 como patrones para la comparación de peso molecular aparente, Carril 5 = producto de rec-hIL-7 de *E. coli* purificado por el solicitante (CYT 99 007).

Figura 7: Análisis de la IL-7 humana recombinante purificada con SDS-PAGE bajo condiciones reductoras después de la desglicosilación. Las muestras de la IL-7 humana glicosilada recombinante purificada se digirieron con PNGasa F. Las muestras cinéticas desde el minuto 2 a las 24 horas se cargaron en el gel. Otra muestra (OO/N) se digirió a lo largo de 24 horas con PNGasa F + O-glicosidasa/ β (1-4)galactosidasa/neuraminidasa/N-acetilglucosaminidasa. Como control, también se cargó IL-7 humana glicosilada y IL-7 humana de *E. coli* en el gel. Entonces se separaron las glicofomas 3N+1O, 2N+1O, 1N+1O, 1O de la IL-7 humana y su forma desglicosilada según su PM calculado en el gel a 33, 27, 24, 18 y 17 kDa, respectivamente.

Figura 8: Análisis del espectro de masas de diferentes glicofomas de rec-hIL-7 purificadas:

- 23 kDa (23179 Da): rec-hIL-7(CHO S,2N+3N)
- 25 kDa (25127 Da): rec-hIL-7(CHO S,3N)

Figura 9: Análisis de electroforesis bidimensional del polipéptido de IL-7 humano hiperglicosilado recombinante purificado. Después de un enfoque isoeléctrico (intervalo de pH 3-10), las glicofomas se separaron en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (tinción con azul de Coomassie).

Figura 10: Análisis del espectro de masas de la complejidad de N-glicanos de hIL-7 recombinante. Muestras de hIL-7 glicosilada purificada se digirieron enzimáticamente con una endoglicosidasa, tal como péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F, Roche). Los oligosacáridos N-enlazados liberados, liberados de la muestra de proteínas por la digestión enzimática, se separaron de la estructura peptídica y se analizaron mediante una espectrometría de masas MALDI-TOF. Los valores m/z que corresponden a cada pico se buscaron en bases de datos internacionales lo cual permitió una identificación precisa del panel de N-glicanos en la molécula de hIL-7.

Figura 11: Caracterización de O-glicanos en hIL-7 recombinante, utilizando lectinas específicas (transferencia de lectinas). Después de la separación de las muestras de proteína y de la transferencia a la membrana, los productos se revelaron con una de las dos lectinas (MAA de *Maackia amurensis*; PNA de *Arachis hypogaea*). Carril 1: patrón de proteína de fetuina, una proteína sialilada, Carril 2: fetuina tratada con una sialidasa, Carril 3: hIL-7, Carril 4: hIL-7 tratada con sialidasa.

Figura 12: Afinidad por lectinas de un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado (selección ELISA). Se utilizaron placas revestidas con lectinas (LEA de *Lycopersicon esculentum*; WGA de *Triticum vulgare*; UEA.I de *Ulex europaeus*; MAA de *Maackia amurensis*; ACA de *Amaranthus caudatus*; AIA de *Artocarpus intergrifolia*; ABA de *Agaricus bisporus*; PHA.L de *Phaseolus vulgaris*) para unir cantidades idénticas de preparaciones de hIL-7 purificada recombinante. Las cantidades de IL-7 unidas, que dependen de la especificidad de la lectina por los restos glicano, fueron reveladas mediante un anticuerpo (Ab) anti-hIL-7 específico acoplado a biotina. El sándwich de lectina-IL-7-Ab fue revelado con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

Figura 13: Bioensayo de actividad IL-7 humana recombinante. La cinética de dosis-respuesta del crecimiento de células PB-1 inducido por r-hIL-7 no glicosilada (expresada en *E. coli*) o r-hIL-7 muy glicosilada (producida en células de mamífero).

Figura 14: Bioensayo de actividad IL-7 humana recombinante. Los datos y las curvas de la cinética de dosis-respuesta obtenidos habitualmente en un bioensayo típico: el crecimiento de células PB-1 fue inducido por r-hIL-7 no glicosilada (expresada en *E. coli*) o r-hIL-7 muy glicosilada o hiperglicosilada (producida en células de mamífero) (los puntos de los datos representan la media $\pm$ DE de la determinación por triplicado).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de IL-7 hiperglicosilada, su fabricación y sus usos en la industria farmacéutica. La presente invención demuestra por primera vez que la actividad y/o las propiedades de la IL-7 pueden verse potenciadas dependiendo del perfil de glicosilación del polipéptido. La presente invención también indica, de forma sorprendente y al contrario que los datos *in vitro*, que la mejor actividad *in vivo* puede lograrse con polipéptidos de IL-7 que tienen al menos 2 a preferiblemente 3 sitios de glicosilación N-enlazados ocupados y un sitio de glicosilación O-enlazado, y una sialilación terminal maximizada de los restos oligosacáridos. La presente invención también describe polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados creados artificialmente que muestran una actividad prolongada (permitiendo con ello una menor frecuencia de administración) y/o una menor inmunogenicidad a largo plazo. Considerando la utilidad de IL-7, estos polipéptidos y composiciones representan moléculas activas muy valiosas y útiles para su uso para regular una respuesta inmunológica en un sujeto, incluyendo un sujeto humano.

Un primer objeto de esta invención, por tanto, reside en una composición de IL-7 hiperglicosilada.

Otro objeto de esta invención se refiere al uso de IL-7 hiperglicosilada para la fabricación de un medicamento que consiste en dicha IL-7 hiperglicosilada y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para tratar un sujeto mamífero.

- 5 También se describe un método para provocar o estimular una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de IL-7 hiperglicosilada.

Otro objeto de esta invención se refiere al uso de una composición de IL-7 hiperglicosilada (y preferiblemente muy sialilada) para la fabricación de un medicamento para provocar o estimular una respuesta inmunológica en un sujeto.

Polipéptido de IL-7

- 10 Dentro del contexto de la presente invención, un "polipéptido de IL-7" indica un polipéptido de IL-7 de mamífero (por ejemplo, humano, de simio, bovino, equino, felino o canino). Más preferiblemente, el polipéptido de IL-7 es un polipéptido de IL-7 humano, en especial para unos usos como producto terapéutico o vacuna. Como alternativa, en especial para su uso en experimentos con primates no humanos o en aplicaciones veterinarias, el polipéptido de IL-7 puede ser cualquier otro polipéptido de IL-7 de mamífero, tal como un polipéptido de IL-7 de simio o un polipéptido canino.

- 15 Los polipéptidos de IL-7 humanos preferidas de esta invención comprenden una secuencia de aminoácidos según se describe en el documento EP 314.415 o en el documento WO 2004/018681 A2, así como cualquiera de sus variantes naturales y homólogos. La secuencia de la IL-7 humana también está disponible en bancos de genes. La proteína de tipo salvaje típica comprende 152 aminoácidos y opcionalmente un resto metionina N-terminal adicional (SEQ ID NO:1). Sus variantes incluyen, más preferiblemente, los variantes alélicos naturales que surgen del polimorfismo natural, incluyendo SNP, variantes de corte y empalme, etc. En una realización específica, la expresión "polipéptido de IL-7" pretende indicar un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 o sus variantes naturales.

- 20 En otra realización, el polipéptido de IL-7 es un polipéptido de IL-7 canino. A este respecto, la invención describe, por primera vez, la secuencia de un polipéptido de IL-7 aislado, que representa otro objeto de esta solicitud. En particular, la invención se refiere a un polipéptido de IL-7 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:7, así como cualquiera de sus variantes naturales, homólogos, o fragmentos distintivos. El término "variante" u "homólogo" se refiere a polipéptidos que se diferencian de SEQ ID NO:7 en una delección, sustitución o adición de uno o de un número limitado de aminoácidos. Preferiblemente, estos variantes u homólogos muestran un porcentaje de coincidencia que es mayor que 85%, preferiblemente mayor que 90%, preferiblemente mayor que 95%, y lo más preferiblemente mayor que 98% con SEQ ID NO:7.

- 25 El polipéptido de IL-7 utilizado en la presente invención es preferiblemente una IL-7 recombinante. El término "recombinante", tal como se emplea en la presente, significa que el polipéptido se obtiene o se deriva de un sistema de expresión recombinante, es decir, de un cultivo de células hospedantes (por ejemplo, microbianas, de insecto, vegetales o de mamífero) o de plantas o animales transgénicos modificados para contener una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-7. "Microbiano" se refiere a proteínas recombinantes fabricadas en sistemas de expresión bacterianos. "De mamífero" se refiere a glicoproteínas recombinantes fabricadas en sistemas de expresión de mamífero. Tal como se analizará a continuación, todas estas células hospedantes deberían expresar preferiblemente, de forma natural o después de la transgénesis, un gen de glicosiltransferasa y/o sialiltransferasa apropiado. Un polipéptido de IL-7 también puede glicosilarse mediante el uso de moléculas de glicosiltransferasa y/o sialiltransferasa apropiadas *in vitro* o *in vivo*, o mediante el injerto de estructuras oligosacáridas.

- 30 Un ejemplo específico de un polipéptido de IL-7 humano es un polipéptido de SEQ ID NO:1 que comprende los puentes disulfuro Cys2-Cys92; Cys34-Cys129; y Cys47-Cys141.

- 35 Además, los polipéptidos de IL-7 de la presente invención pueden comprender la secuencia de un polipéptido de IL-7 maduro, o comprender también restos aminoácidos adicionales, tales como un péptido de secreción, por ejemplo. Los ejemplos preferidos de dichos péptidos de secreción incluyen, sin limitación, un péptido señal seleccionado del grupo que consiste en el péptido señal de EPO, el péptido señal de SEAP, el péptido señal de IgGkappa, el péptido señal de lactotransferrina/vitronectina, el péptido señal de VIP/vitronectina, y el péptido señal de citostatina-bis. La secuencia de estos péptidos señal se indica, respectivamente en SEQ ID NO:13 a 18. En una realización específica, el péptido señal es una construcción híbrida fabricada por los inventores, entre secuencias derivadas de los péptidos señal de EPO e IL-7. La secuencia de este péptido señal, denominado EPy7 o EP7, se indica en SEQ ID NO:19 y representa un objeto concreto de esta invención.

IL-7 hiperglicosilada y composiciones

- 45 Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "IL-7 hiperglicosilada" indica un polipéptido de IL-7 que

tiene al menos tres sitios de glicosilación ocupados, es decir, tiene al menos tres restos aminoácidos glicosilados.

Un “sitio de glicosilación” indica cualquier resto aminoácido o región en un polipéptido que está sujeto a una glicosilación, es decir, la unión de una estructura de carbohidrato. Estos sitios generalmente son sitios de N-glicosilación (es decir, cualquier resto aminoácido o región en un polipéptido que permite la unión de una estructura de carbohidrato a través de un N-enlace) y/o sitios de O-glicosilación (es decir, cualquier resto aminoácido o región en un polipéptido que permite la unión de una estructura de carbohidrato a través de un O-enlace). Las secuencias consenso para los sitios de glicosilación son conocidas *per se* en la técnica. Como ilustración, un sitio de N-glicosilación consenso generalmente tiene la siguiente estructura: Asn-X-Ser/Thr, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina. Tal como se describirá a continuación, estos sitios de glicosilación pueden estar presentes en la naturaleza dentro de una secuencia del polipéptido de IL-7 y/o añadirse o crearse artificialmente dentro de dicha secuencia.

La expresión “composición de IL-7 hiperglicosilada” indica una composición de IL-7 en la que al menos 80% de los polipéptidos de IL-7 tienen al menos tres sitios de glicosilación ocupados, es decir, tienen al menos tres restos aminoácidos glicosilados. Preferiblemente, esta composición comprende al menos 80% de polipéptidos de IL-7 que están glicosilados, al menos en tres sitios de N-glicosilación y, opcionalmente, en un sitio de O-glicosilación. Lo más preferiblemente, esta composición está fundamentalmente exenta de polipéptidos de IL-7 no glicosilados o monoglicosilados y, por tanto, comprende como máximo 20% de polipéptidos de IL-7 biglicosilados. En una realización preferida, una composición de IL-7 hiperglicosilada indica una composición de IL-7 en la que al menos 90% de los polipéptidos de IL-7 están glicosilados en tres sitios de N-glicosilación y, opcionalmente, en un sitio de O-glicosilación. Lo más preferiblemente, esta composición está fundamentalmente exenta de polipéptidos de IL-7 no glicosilados o monoglicosilados y, por tanto, comprende como máximo 10% de polipéptidos de IL-7 bi-N-glicosilados con o sin polipéptidos de IL-7 mono-O-glicosilados.

La secuencia de aminoácidos primaria de IL-7 comprende tres sitios de N-glicosilación putativos, concretamente los restos asparagina (Asn) en las posiciones 70, 91 y 116 (con respecto a la secuencia de tipo salvaje humana, véase SEQ ID NO:1). Además, la presente invención demuestra que la secuencia de IL-7 también contiene un sitio de O-glicosilación, concretamente el resto treonina (Thr) en la posición 110. En una realización concreta, un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de la presente invención es un polipéptido de IL-7 que tiene los anteriores tres sitios de N-glicosilación ocupados asociados o no a un sitio de O-glicosilación ocupado, y una composición de IL-7 hiperglicosilada es una composición de IL-7 en la que al menos 80% de los polipéptidos de IL-7 están glicosilados en los anteriores sitios de N-glicosilación y, opcionalmente, también en el sitio de O-glicosilación.

En una realización concreta, un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado puede comprender otros sitios de glicosilación añadidos o creados artificialmente. Por consiguiente, un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de la presente invención es un polipéptido de IL-7 que tiene al menos tres sitios de N-glicosilación y un sitio de O-glicosilación ocupados, siendo dichos sitios naturales y/o añadidos/creados artificialmente; y una composición de IL-7 hiperglicosilada es una composición de IL-7 en la que al menos 80% de los polipéptidos de IL-7 están glicosilados en al menos cuatro sitios de glicosilación, siendo dichos sitios naturales y/o añadidos/creados artificialmente,

A este respecto, la presente invención ahora describe polipéptidos de IL-7 que tienen una secuencia de aminoácidos modificada, en la que dicha secuencia comprende al menos un sitio de glicosilación creado artificialmente. Según realizaciones concretas, los polipéptidos de IL-7 de esta invención comprenden 1, 2, 3 ó 4 sitios de glicosilación creados artificialmente, más preferiblemente 1, 2 ó 3, y aún más preferiblemente 1 ó 2. Los sitios de glicosilación creados artificialmente son preferiblemente sitios de glicosilación N-enlazados. Los sitios de N-glicosilación consenso generalmente tienen la siguientes estructura: Asn-X-Ser/Thr, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina.

Los sitios de glicosilación pueden crearse o añadirse químicamente a partir de oligonucleótidos sintéticos ensamblados o utilizando diversas técnicas que incluyen métodos de mutagénesis en diversas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos primaria de IL-7, y según técnicas conocidas *per se* en la técnica. Debido a que el polipéptido de IL-7 modificado mantendrá la capacidad para unirse a un receptor de IL-7, el sitio o sitios de glicosilación se crean, lo más preferiblemente, dentro de una región o regiones, o de un dominio o dominios, de la secuencia del polipéptido de IL-7 que no altere o alteren la capacidad de IL-7 para unirse a un receptor de IL-7. Más preferiblemente, el sitio o sitios se introducen fuera de las alfa-hélices del polipéptido, preferiblemente excepto en la proximidad inmediata de los restos glicina. Preferiblemente, se introducen en la región más flexible, evitando regiones que son más rígidas e importantes para la estructura terciaria del polipéptido. Preferiblemente, la creación de un sitio de glicosilación no afecta a ningún resto cisteína implicado en un puente disulfuro (por ejemplo, Cys 2, 34, 47, 92, 129 y 141), ni a ningún resto crítico implicado en la interacción del polipéptido de IL-7 con su receptor cognado (por ejemplo, Ser 19, Leu 23 y 77, Tyr 12, Val 15, Gln 22, Lys 81 y Glu 84), ni ningún resto conservado implicado en la actividad del polipéptido (por ejemplo, Arg 133, Gln 136, Glu 137, Lys 139 y 144, Thr 140 y Asn 143). Los sitios de glicosilación se crean generalmente mediante mutación, delección o adición de uno o varios restos aminoácidos dentro de la secuencia primaria de un polipéptido de IL-7 de referencia, para crear un sitio de glicosilación consenso típico.

En una realización concreta, la presente invención se refiere a polipéptidos de IL-7 que comprenden la secuencia de un polipéptido de IL-7 humano (o de mamífero) que comprende una o varias modificaciones de aminoácidos seleccionadas de Lys28Asn - Ile30Ser - Ile30Thr - Ile30Asn - Ser32Thr - Leu35Ser - Leu35Thr - Glu38Ser - Glu38Thr - Phe39Ser - Phe39Thr - Phe42Ser - Phe42Thr - Glu52Ser - Glu52Thr - Val82Asn - Glu84Thr - Glu84Ser - Lys97Asn - Arg99Thr - Arg99Ser - Ala102Asn - Leu104Thr - Leu104Ser - Leu104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Ile145Asn - Met147Thr - Met147Ser - Met147Asn - Thr149Ser (o de las correspondientes posiciones en otros polipéptidos de IL-7 de mamífero).

Los ejemplos específicos de polipéptidos de IL-7 (humana) de esta invención comprenden las modificaciones de aminoácidos descritas en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Análogo de polipéptido de IL-7	Cambios en los aminoácidos
HG28a	Lys28Asn; Ile30Ser
HG28b	Lys28Asn; Ile30Thr
HG30	Ile30Asn; Ser32Thr
HG33a	Leu35Ser
HG33b	Leu35Thr
HG36a	Glu38Ser
HG36b	Glu38Thr
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG50a	Glu52Ser
HG50b	Glu52Thr
HG82a	Val82Asn; Glu84Ser
HG82b	Val82Asn; Glu84Thr
HG97a	Lys97Asn; Arg99Ser
HG97b	Lys97Asn; Arg99Thr
HG102a	Ala102Asn; Leu104Ser
HG102b	Ala102Asn; Leu104Thr
HG104a	Leu104Asn; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG145a	Ile145Asn; Met147Ser
HG145b	Ile145Asn; Met147Thr
HG147	Met147Asn; Thr149Ser

Las anteriores modificaciones de aminoácidos crean sitios de N-glicosilación sin alterar sustancialmente la afinidad

de unión de IL-7, creando con ello mejores polipéptidos de IL-7 según la presente invención.

La expresión “sin altera sustancialmente la afinidad de unión” significa que la afinidad de unión no se altera ni se reduce sin afectar a los efectos *in vivo* que resultan de la interacción con el receptor. Cuando se cuantifica *in vitro*, la afinidad de unión puede reducirse en menos del 50%, preferiblemente menos del 40%, preferiblemente menos del 30%, preferiblemente menos del 20%, y preferiblemente menos del 5%.

Además, las anteriores modificaciones pueden combinarse para crear varios sitios de glicosilación adicionales dentro de un polipéptido de IL-7 de esta invención. A este respecto, la invención se refiere a cualquier polipéptido de IL-7 biológicamente activo que tenga la secuencia primaria de la interleuquina-7 (humana o de mamífero) modificada mediante la adición de al menos uno a cuatro sitios de glicosilación (N-enlazados) adicionales. Otra realización preferida de esta invención es un polipéptido de IL-7 biológicamente activo que comprende la secuencia primaria de la interleuquina-7 que comprende uno o dos sitios de glicosilación (N-enlazados) adicionales.

Los polipéptidos de IL-7 más preferidos de esta invención son biológicamente activos, es decir, son capaces de unirse a un receptor de interleuquina-7 y demostrar actividad *in vitro* en un bioensayo específico y/o tienen un tiempo medio de residencia (MRT) *in vivo* mayor.

La comparación de las actividades entre el patrón no glicosilado y la IL-7 hiperglicosilada se tratan en un estudio con un bioensayo de dosis/respuesta, en el que un valor de ED50 se corresponde con una dosis igual a la mitad de la actividad máxima. La hiperglicosilación habitualmente conduce a una menor actividad en el bioensayo, que no se traduce en una menor actividad *in vivo*. En la presente situación, el perfil cinético extendido de hecho mejora la actividad *in vivo*.

A pesar del hecho de que la ED50 no refleja la actividad de IL-7 *in vivo*, permite una comparación entre diferentes muestras con el mismo nivel de glicosilación. En este marco, unos valores típicos de ED50 para un patrón no glicosilado variarán entre 0,5 a 2,0 ng de IL-7/ml, mientras que unos valores de ED50 con hiperglicosilación variarán entre 1,5 a 3,5 ng de IL-7 hiperglicosilada/ml.

Los polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados de la invención muestran una mejor estabilidad, y una semivida y un tiempo medio de residencia *in vivo* extendidos en hospedantes mamíferos. La expresión “mejor estabilidad”, “semivida y tiempo medio de residencia extendidos” deben entenderse en comparación con las formas no glicosiladas. Preferiblemente, el aumento en la semivida es al menos aproximadamente 3 x, preferiblemente al menos aproximadamente 5 a 20 x. El tiempo medio de residencia (MRT) significa la media del tiempo de residencia de cada molécula de IL-7 en la sangre de pacientes después de la dosificación inicial. Preferiblemente, el aumento en el MRT es al menos aproximadamente 2 x, o preferiblemente al menos aproximadamente 4 a 10 x, comparado con el MRT de las formas no glicosiladas.

Por ejemplo, la semivida plasmática de la forma hiperglicosilada demostró estar en el intervalo de 30 a 40 horas, mientras que la semivida plasmática de la forma no glicosilada es habitualmente de 5 a 8 horas (cuando ambas formas se administran en las mismas condiciones, es decir, en una inyección por vía subcutánea). El tiempo medio de residencia (MRT) es de aproximadamente 40 horas, frente a las aproximadamente 10 horas de la forma no glicosilada.

Debe entenderse que la invención también incluye cualquier fragmento distintivo de un polipéptido de IL-7 de esta invención, es decir, cualquier fragmento que comprenda una modificación de aminoácidos según se describió anteriormente, o cualquier fragmento que comprenda un sitio de glicosilación creado artificialmente según se describió anteriormente. Estos fragmentos generalmente contienen al menos 5 restos aminoácidos, generalmente al menos 8, 9, 10, 11, 12 ó 15 restos, y pueden contener hasta 20, 30, 40, 50 o más restos aminoácidos consecutivos. Estos fragmentos pueden utilizarse como antagonistas o como inmunógenos, para generar anticuerpos específicos.

Además, aunque se han indicado las anteriores posiciones de aminoácidos haciendo referencia a la secuencia del polipéptido de IL-7 humano, debe entenderse que la presente invención también incluye polipéptidos de IL-7 que tienen la secuencia primaria de la IL-7 de mamífero modificada por mutaciones homólogas en secuencias de mamífero basadas en el alineamiento de secuencias frente a la secuencia humana.

Una realización preferida de esta invención se refiere a nuevos polipéptidos de IL-7 biológicamente activos que comprenden una o varias modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: Phe39Ser - Phe39Thr - Phe42Ser - Phe42Thr - Leu104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Met147Asn y sus combinaciones, o un fragmento distintivo de éstas.

Los polipéptidos de IL-7 modificados más preferidos de esta invención se describen en la siguiente tabla 2.

Tabla 2

Análogo de polipéptido de IL-7	Cambios en los aminoácidos
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG104a	Leu104Asn; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG147	Met147Asn; Thr149Ser

Otro objeto concreto de esta invención es un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado que comprende una secuencia primaria de aminoácidos según se describió anteriormente.

5 Unidades de oligosacárido

La estructura y el número de las unidades de oligosacáridos unidas a un sitio de glicosilación concreto en el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de esta invención pueden ser variables. Pueden ser, por ejemplo, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, manosa, galactosa, glucosa, fucosa, xilosa, ácido glucurónico, ácido idurónico y/o ácidos siálicos.

10 Más preferiblemente, los polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados comprenden (o están enriquecidos en) una cadena o cadenas de carbohidratos N-enlazados y/u O-enlazados seleccionadas de:

a) una cadena de azúcar de tipo mamífero, preferiblemente del tipo expresado por las células CHO;

15 b) una cadena de azúcar que comprende una cadena de N-carbohidrato compleja (por ejemplo, una estructura triantenaria o biantenaria), que más preferiblemente contiene un alto contenido en moléculas de manosa y acetilglucosamina y gran cantidad de restos ácido siálico terminales;

c) una cadena de azúcar que comprende una cadena de O-carbohidrato sin y preferiblemente con un resto ácido siálico terminal;

d) una cadena de azúcar sialilada por alfa-2,6-sialiltransferasa o alfa-2,3-sialiltransferasa; y/o

e) una cadena de azúcar sialilada que presenta entre 3 y 30 sialil-N-acetilgalactosamina, preferiblemente de 7 a 23.

20 La cadena o cadenas de carbohidratos particularmente preferidas comprenden una estructura triantenaria o biantenaria con una sialilación terminal parcial o completa. Otras cadenas de carbohidratos preferidas comprenden estructuras triantenarias y una tri- o bisialilación y/o una estructura diantenaria con una disialilación. Los ejemplos de estos carbohidratos se describen en la tabla 4, que incluyen los motivos nº 2420, 2623, 2785 y 3092.

25 Según otra realización específica, el polipéptido de interleuquina-7 hiperglicosilado de esta invención tiene un punto isoeléctrico medio menor que 6,5 y un peso molecular aparente medio mayor que 27 kDa, entre 28 kDa y 65 kDa (teórico para una glicosilación 7N + 1O), preferiblemente entre 28 kDa y 35 kDa (tal como se indica para una glicosilación 3N + 1O), mediante una electroforesis en gel (confirmada por una transferencia Western) que se traduce en 25 kDa mediante un análisis de espectrometría de masas.

30 En una realización concreta, el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de esta invención es producido por un mutante de glicosilación de mamífero que expresa de forma estable la α -2,6-sialiltransferasa, y presenta una deficiencia en la actividad CMP-Neu5Ac hidrolasa, preferiblemente un mutante de glicosilación de CHO. Esta glicosilación generalmente incluye N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, manosa, galactosa, glucosa, fucosa, xilosa, ácido glucurónico, ácido idurónico y/o ácidos siálicos.

En otra realización, el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se produce mediante tecnología recombinante en una célula hospedante humana, que puede seleccionarse de líneas de células epiteliales o estromáticas humanas, HEK-293 (riñón embrionario humano), HER (retina embrionaria humana), HEK (queratinocitos epidérmicos humanos), líneas de células epiteliales corticales humanas o de timo humanas, líneas de células de la médula ósea humanas o estromáticas de la médula ósea humanas.

Los polipéptidos de interleuquina-7 hiperglicosilados de esta invención más preferidos muestran la siguiente o siguientes características:

- a) tienen un mejor perfil de secreción y velocidad de producción en líneas celulares productivas recombinantes; y/o
- b) contienen un mayor grado de restos ácido siálico por polipéptido de IL-7, lo cual conduce a un menor valor del punto isoelectrico y a mejorar el tiempo medio de residencia; y/o
- c) están protegidos frente a la agregación intermolecular; y/o
- d) tienen menos susceptibilidad a la proteólisis; y/o
- e) contienen sitios antigénicos enmascarados, lo cual refleja un menor propensión inmunogénica, una menor vulnerabilidad a la captura, procesamiento y presentación por APC (células presentadoras de antígenos) a través de una molécula de MHCII; y/o
- f) tienen mayor estabilidad química; y/o
- g) tienen mayor semivida biológica *in vivo* (isoforma de IL-7 de acción a largo plazo) comparado con el péptido de origen no glicosilado; y/o
- h) tienen una mayor actividad farmacológica *in vivo* comparado con la proteína de origen no glicosilada, en gran parte debido a un mejor tiempo medio de residencia (MRT); y/o
- i) permiten un programa de dosificación menos frecuente, de tres/cuatro veces semanales a dos o una vez semanal o una vez cada quince días para los productos de acción a más largo plazo; y/o
- j) muestran un mejor perfil farmacocinético (menos picos de concentración y mejor tiempo medio de residencia); y/o
- k) muestran un peso molecular medio mayor que 25 kDa según se determina mediante un análisis de espectrometría de masas, o 27 kDa según se determina mediante un análisis de SDS-PAGE, y un punto isoelectrico medio menor que 6,5.

Los polipéptidos de esta invención pueden estar en forma de un monómero, o asociados o complejados con un compuesto concreto elegido. A este respecto, en una realización concreta, el confórmero de IL-7 está asociado con el factor del crecimiento de hepatocitos ("HGF") como un heterodímero. El heterodímero puede obtenerse por medios químicos, mediante formación de complejos, o mediante tecnología recombinante (es decir, mediante fusión genética).

En otra realización concreta, el polipéptido de IL-7 se une funcionalmente a una porción Fc de una cadena pesada de IgG, generalmente a través de una región de bisagra peptídica. Estas moléculas de fusión tienen una estabilidad y una semivida *in vivo* potencialmente mayores. El resto IgG es, lo más preferiblemente, una IgG1 o IgG4 humana.

En otra realización concreta, el polipéptido de IL-7 está funcionalmente asociado con una albúmina de suero humana ("HSA") o con una porción de una HSA, como una proteína de fusión. Estas moléculas de fusión tienen una estabilidad potencialmente mayor y una semivida prolongada *in vivo*.

Otro objeto de esta invención es una composición de IL-7 hiperglicosilada. Estas composiciones preferiblemente comprenden al menos 80%, preferiblemente entre 80% y 95%, de polipéptidos de IL-7 que están glicosilados en al menos tres restos aminoácidos diferenciados, que pueden estar presentes en la naturaleza dentro de una secuencia de un polipéptido de IL-7 (por ejemplo, sitios de carbohidratos N-enlazados y O-enlazados consenso) y/o ser un sitio o sitios de glicosilación creados artificialmente, tal como se analizó anteriormente.

Según realizaciones específicas concretas, la invención se refiere a composiciones de IL-7 hiperglicosiladas que comprenden:

- a) una mayoría (>80%, preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más de aproximadamente 95%) de interleuquina-7 glicosilada en los 3 sitios de carbohidratos N-enlazados consenso (Asn 70/91/116) y también glicosilada o no en un sitio de carbohidrato O-enlazado (Thr 110); preferiblemente, la composición contiene una minoría (<20%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%) de interleuquina-7 glicosilada en 2 sitios de carbohidratos N-enlazados consenso (asociados o no a un sitio de carbohidrato O-enlazado) y/o está fundamentalmente exenta de proteínas monoglicosiladas o no glicosiladas; o

- 5 b) una mayoría (>80%, preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más de aproximadamente 95%) de un análogo de interleuquina-7 biológicamente activo, que tiene la secuencia primaria de aminoácidos de la IL-7 modificada para introducir un sitio adicional de glicosilación, glicosilado en 4 sitios de carbohidratos N-enlazados y también glicosilado o no en un sitio de carbohidrato O-enlazado (Thr 110); preferiblemente, la composición contiene una minoría del mismo análogo (<20%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%) glicosilado sólo en 3 ó 2 sitios de carbohidratos N-enlazados (asociados o no a un sitio de carbohidrato O-enlazado) y/o está fundamentalmente exenta de proteínas monoglicosiladas o no glicosiladas; o
- 10 c) una mayoría (>80%, preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más de aproximadamente 95%) de un análogo de interleuquina-7 biológicamente activo, que tiene la secuencia primaria de aminoácidos de la IL-7 modificada para introducir dos sitios adicionales de glicosilación, glicosilado en 5 sitios de carbohidratos N-enlazados y también glicosilado o no en un sitio de carbohidrato O-enlazado (Thr 110); preferiblemente, la composición contiene una minoría del mismo análogo (<20%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%) glicosilado sólo en 4, 3 ó 2 sitios de carbohidratos N-enlazados, asociados o no a un sitio de carbohidrato O-enlazado y/o está fundamentalmente exenta de proteínas monoglicosiladas o no glicosiladas; o
- 15 d) una mayoría (>80%, preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más de aproximadamente 95%) de un análogo de interleuquina-7 biológicamente activo, que tiene la secuencia primaria de aminoácidos de la IL-7 modificada para introducir tres sitios adicionales de glicosilación, glicosilado en 6 sitios de carbohidratos N-enlazados y también glicosilado o no en un sitio de carbohidrato O-enlazado (Thr 110); preferiblemente, la composición contiene una minoría del mismo análogo (<20%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%) glicosilado sólo en 5, 4, 3 ó 2 sitios de carbohidratos N-enlazados, asociados o no a un sitio de carbohidrato O-enlazado y/o está fundamentalmente exenta de proteínas monoglicosiladas o no glicosiladas; o
- 20 e) una mayoría (>80%, preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más de aproximadamente 95%) de un análogo de interleuquina-7 biológicamente activo, que tiene la secuencia primaria de aminoácidos de la IL-7 modificada para introducir cuatro sitios adicionales de glicosilación, glicosilado en 7 sitios de carbohidratos N-enlazados y también glicosilado o no en un sitio de carbohidrato O-enlazado (Thr 110); preferiblemente, la composición contiene una minoría del mismo análogo (<20%, preferiblemente menos de aproximadamente 10%) glicosilado sólo en 6, 5, 4, 3 ó 2 sitios de carbohidratos N-enlazados, asociados o no a un sitio de carbohidrato O-enlazado y/o está fundamentalmente exenta de proteínas monoglicosiladas o no glicosiladas.
- 25

30 La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las anteriores composiciones como sustancia activa.

Ácidos nucleicos

- También se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-7 según se analizó anteriormente. La molécula de ácido nucleico puede ser cualquier molécula de ADN o ARN, generalmente una molécula de ADNc.
- 35 Se describe concretamente un ácido nucleico que comprende los restos nucleótidos 79 al final de SEQ ID NO:2, así como fragmentos distintivos y su hebra complementaria.
- También se describe un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:4, así como cualquiera de sus fragmentos distintivos, sus variantes (que tienen al menos 90% de coincidencia con SEQ ID NO:4), y su hebra complementaria.
- 40 También se describe un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:6, así como cualquiera de sus fragmentos distintivos, sus variantes (que tienen al menos 90% de coincidencia con SEQ ID NO:6), y su hebra complementaria.
- También se describe un ácido nucleico que comprende los restos nucleótidos 79 al final de SEQ ID NO:6, así como sus variantes (que tienen al menos 90% de coincidencia con SEQ ID NO:6), y su hebra complementaria. La invención también incluye un polipéptido codificado por dichas secuencias (por ejemplo, SEQ ID NO:7).
- 45 El término "variante", tal como se empleó anteriormente en relación con un ácido nucleico, indica más concretamente una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de referencia bajo condiciones rigurosas y/o que codifica un polipéptido que tiene el mismo tipo de actividad que el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Los variantes más preferidos muestran al menos entre 92% y 99% (por ejemplo, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de coincidencia con la secuencia de referencia.

Otro objeto específico de esta invención es un ácido nucleico que comprende la secuencia de:

- 50 CTG AAT AAC GAA ACT AAC, SEQ ID NO:8
AAC TTC ACT AAG, SEQ ID NO:9
GCC AAC GGT ACC, SEQ ID NO:10

CTG AAC GAC AGC TGT, SEQ ID NO:11, o

ATC TTG AAC GGG, SEQ ID NO:12, o sus combinaciones.

Los ejemplos específicos de ácidos nucleicos comprenden la secuencia de nucleótidos según se indica en cualquiera de SEQ ID NO:8 a 12.

- 5 Se describe un vector de clonación y/o de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente. El vector puede ser cualquier vector procariota o eucariota, generalmente un vector eucariota, y puede seleccionarse de un plásmido, un cósmido, un vector vírico, un cromosoma artificial, etc. El vector puede comprender cualquier secuencia reguladora que permita la expresión apropiada del ácido nucleico codificador en una célula hospedante seleccionada, por ejemplo, un promotor, un terminador, una poliA, un origen de la replicación, una región de integración (por ejemplo, una región homóloga), un intrón, secuencias UTR, un gen marcador, etc.

Se describe un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente, que incluye un péptido señal, unida operablemente a elementos reguladores que permiten la expresión de dicho ácido nucleico en una célula hospedante o un hospedante mamífero.

- 15 Los elementos reguladores preferidos incluyen un promotor, que puede seleccionarse, sin limitación, de promotores víricos, celulares y sintéticos, incluyendo promotores constitutivos, específicos de tejido, o regulados, en particular del grupo que consiste en el promotor de CMV, el promotor de E1Fa, y el promotor de metalotioneína. Otros elementos reguladores que pueden estar contenidos dentro de los vectores de esta invención incluyen, sin limitación, un gen Bcl-2, secuencias UTR, y secuencias MAR.

En una realización preferida, el vector es un vector de expresión episómico.

- 20 Los anteriores ácidos nucleicos y vectores pueden utilizarse, por ejemplo, para producir polipéptidos de IL-7 de mamífero recombinantes en diversas células hospedantes u hospedantes competentes, así como para fines de terapia génica.

- 25 También se describe una célula hospedante recombinante que comprende un ácido nucleico o un vector según se describió anteriormente. Esta célula recombinante puede ser procariota o, más preferiblemente, eucariota, tal como una célula de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero, por ejemplo.

En una realización preferida, la célula hospedante es una célula de mamífero, preferiblemente seleccionada de PERC6, células NSO y células BHK, preferiblemente células CHO; o una línea celular humana. Los vectores, las construcciones y las células recombinantes se describirán con más detalle en una sección posterior de esta solicitud, pero no se limitan a éstos.

30 Sustancias farmacológicas y composiciones farmacéuticas

También se describe una sustancia farmacológica que comprende el producto deseado, un polipéptido de IL-7 según se describió anteriormente, generalmente un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado. Más preferiblemente, la sustancia farmacológica contiene menos de aproximadamente 10% de polipéptidos de IL-7 no glicosilados o monoglicosilados y/o está fundamentalmente exenta de impurezas relacionadas con el producto.

- 35 Una sustancia farmacológica según se describió anteriormente resulta útil para la fabricación de un medicamento ("producto farmacológico") o de una composición farmacéutica.

Una sustancia farmacológica preferida también está sustancialmente exenta de impurezas relacionadas con el producto.

- 40 Dentro del contexto de la presente solicitud, la expresión "sustancia farmacológica" se refiere a un producto adecuado para su uso como principio activo de un medicamento. La "sustancia farmacológica" según esta invención es, por naturaleza, un producto complejo, es decir, es el resultado de su método de producción (por ejemplo, la tecnología del ADN recombinante).

- 45 La presente invención ahora indica que, para producir unos efectos terapéuticos y de potenciación de vacunas eficaces, una sustancia farmacológica o una composición farmacéutica de IL-7 debe contener, como especie molecular principal, una composición de polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados.

- 50 La expresión "sustancialmente exento", tal como se emplea en la presente, indica que la sustancia farmacológica no contiene cantidades significativas o adversas de impurezas relacionadas con el producto e impurezas relacionadas con el proceso. Más concretamente, la sustancia farmacológica debe contener menos del 5%, más preferiblemente menos del 3%, aún más preferiblemente menos del 2% de impurezas relacionadas con el producto e impurezas relacionadas con el proceso. Las sustancias farmacológicas más preferidas contienen menos de aproximadamente 1% de impurezas relacionadas con el producto y sólo cantidades traza de impurezas relacionadas con el proceso.

Las sustancias relacionadas con el producto de IL-7 indican variantes moleculares de IL-7 que incluyen, por ejemplo, fragmentos peptídicos o polipeptídicos activos o inactivos de IL-7. Las impurezas relacionadas con IL-7 incluyen, por ejemplo, polipéptidos de IL-7 humana que comprenden puentes mono- o bidisulfuro, IL-7 truncada, IL-7 recombinante desamidada, proteínas diméricas o multiméricas que comprenden IL-7, la forma de metionina oxidada o sus combinaciones.

Cualquiera que sea su actividad biológica, estos variantes moleculares de IL-7 e impurezas relacionadas con IL-7 deben minimizarse o rechazarse estrictamente de la sustancia farmacológica.

Las impurezas relacionadas con el proceso incluyen ADN, endotoxinas, residuos celulares, virus, etc.

Por tanto, una sustancia farmacológica preferida es una sustancia farmacológica en la que la cantidad total en peso de una composición de IL-7 hiperglicosilada comprende al menos 95% en peso, preferiblemente al menos 98% en peso, más preferiblemente al menos 99,5% en peso de una composición de IL-7 hiperglicosilada según la invención.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una sustancia farmacológica o una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, y uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables o compatibles.

La invención demuestra que las composiciones farmacéuticas que comprenden una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente aumentan evidentemente las propiedades de vacuna de la IL-7 y su capacidad para estimular respuestas inmunológicas específicas de antígenos.

El diluyente farmacéuticamente compatible o fisiológicamente aceptable puede seleccionarse de disolución salina, disoluciones o suspensiones de neutras a ligeramente ácidas, isotónicas y tamponadas, y más preferiblemente de sacarosa, trehalosa y aminoácidos. El vehículo farmacéuticamente compatible está contenido preferiblemente en un tampón apropiado para formar una disolución isotónica. Un tampón apropiado tiene preferiblemente un intervalo de pH entre 4,5 a 7,5, preferiblemente de 5,0 a 7,0, aún más preferiblemente de aproximadamente 5,5, y es preferiblemente una sal orgánica seleccionada de un tampón citrato de sodio o un tampón acetato de amonio. La composición farmacéutica puede estar en forma de una suspensión, disolución, gel, polvos, sólido, etc. La composición está preferiblemente en forma líquida.

La composición puede comprender agentes estabilizantes, tales como azúcares, aminoácidos, proteínas, tensioactivos, etc. La composición puede comprender cualquier disolución salina, incluyendo fosfatos, cloruros, etc.

Una composición farmacéutica concreta según la invención comprende, además de la sustancia farmacológica activa, una proteína y/o un tensioactivo. La presencia de una proteína o de cualquier otra molécula de alto peso molecular de origen natural reduce la exposición de la IL-7 al sistema inmunológico del hospedante y, por tanto, evita efectos secundarios. Más preferiblemente, la proteína no es inmunogénica en el sujeto, tal como cualquier proteína de origen humano. El ejemplo más preferido de proteína es la albúmina de suero humana. El tensioactivo puede seleccionarse de tensioactivos conocidos, tales como los productos de polisorbato, preferiblemente Tween20™ o Tween80™. Una composición específica de esta invención comprende albúmina de suero humana (preferiblemente de 2 a 5 mg/ml) o polisorbato (Tween20 o Tween80 (generalmente al 0,005%)) o cualquier otra sustancia, tal como una sustancia tensioactiva, un aminoácido (por ejemplo, arginina, glutamato, o una mezcla de arginina y glutamato) o un azúcar (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, sorbitol) capaz de evitar la inmunogenicidad de IL-7 debida a la agregación de las proteínas y/o a la persistencia local del producto farmacológico en el sitio de inyección después de la administración de la composición.

A este respecto, objetos concretos de esta invención residen en composiciones farmacéuticas que contienen una composición de interleuquina-7 hiperglicosilada a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a 50 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 3 mg/ml a 20 mg/ml. Preferiblemente, la cantidad eficaz de interleuquina-7 glicosilada que se vaya a administrar comprende entre aproximadamente 10 y 200 µg/kg/semana, preferiblemente entre aproximadamente 10 y 60 µg/kg/semana, por ejemplo para el tratamiento o la prevención de enfermedades infecciosas.

En vista de las propiedades mejoradas de los polipéptidos y las composiciones de esta invención, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con menos frecuencia que las composiciones o los productos de la técnica anterior en una cantidad equivalente para obtener efectos terapéuticos comparables. De modo más específico, en una realización típica, las composiciones se administran 3 veces semanales, 2 veces semanales, una vez semanal, una vez cada semana alterna, una vez mensual, una o dos veces antes de una vecunación o antes y después de una vacunación. Un régimen de dosificación preferido consiste en administrar la composición farmacéutica una vez cada 7, 10 ó 14 días.

Las vías de administración preferidas son las vías parenterales. La vía parenteral es preferiblemente una administración intratumoral, más preferiblemente intravenosa o subcutánea. También incluye inyecciones intraarteriales, intraperitoneales o intramusculares. Sin embargo, debe entenderse que puede contemplarse cualquier otra vía de administración adecuada dependiendo del estado de salud y de la reactividad del paciente.

- En una realización concreta, la vía de administración es la vía oral. En comparación con otras hormonas polipeptídicas, la vía oral es desde luego aceptable para la IL-7 hiperglicosilada por la excepcional estabilidad de esta proteína. Las composiciones de la invención entonces están preferiblemente en una forma sólida, tal como un comprimido o polvos o una cápsula, o en una forma líquida, tal como un jarabe o una emulsión, preparadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. Preferiblemente, el propio vehículo es estable en el tracto gastrointestinal y en el sistema circulatorio, y muestra una semivida plasmática aceptable.
- Resultan ventajosas las cápsulas resistentes a los ácidos gástricos, tales como cápsulas resistentes a los ácidos gástricos que contienen una microemulsión o una formulación en liposomas del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado.
- La composición farmacéutica puede comprender otros ingredientes activos, tales como agentes inmunoestimulantes, preferiblemente seleccionados de un factor del crecimiento de células hematopoyéticas, una molécula antigénica (o antígeno) y un adyuvante, para un uso combinado, separado o secuencial.
- Estos ingredientes activos adicionales pueden formularse en combinación con la IL-7, o de manera separada, para un uso combinado, separado o secuencial. En una primera variante, los ingredientes activos se formulan juntos, en el mismo recipiente o receptáculo. En otra variante preferida se acondicionan por separado, es decir, en recipientes o receptáculos diferenciados. Según esta realización, los ingredientes pueden administrarse por separado, por ejemplo, de modo simultáneo o secuencial (por ejemplo, en diferentes sitios de inyección o en diferentes momentos), para producir el efecto biológico más eficaz. Además, tal como se mencionó anteriormente, pueden realizarse administraciones repetidas de uno o de los dos ingredientes activos.
- A este respecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, y un ingrediente activo seleccionado de un inmunoestimulante y una molécula antigénica, para un uso combinado, separado o secuencial. Los adyuvantes preferiblemente se formulan por separado.
- El factor del crecimiento de células hematopoyéticas se selecciona preferiblemente del factor de células pluripotenciales (SCF), en particular la forma soluble del SCF, G-CSF, GM-CSF, ligando de Flt-3, IL-15 e IL-2. Los ejemplos típicos de citoquinas o quimioquinas para la potenciación de vacunas incluyen citoquinas que inducen y/o estimulan una respuesta inmunológica de tipo Th1. La citoquina se selecciona preferiblemente de un α - o γ -interferón, IL-2, IL-12, RANTES, B7-1, MIP-2 y MIP-1 α . Debe entenderse que pueden utilizarse otros factores, tales como activadores de células NK y/o activadores de células NKT, FGF7 o FGF10, interleuquinas y/u hormonas en combinación con IL-7 para proporcionar más beneficios terapéuticos.
- Una composición específica de esta invención comprende una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, y un factor de células pluripotenciales, en particular su forma soluble, IL-15 y/o ligado de Flt-3 y/o FGF10. Otra composición específica de esta invención comprende una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, y una citoquina seleccionada de α - o γ -interferón, IL-2, IL-12, RANTES, y MIP-1 α .
- Otra composición específica de esta invención comprende una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, un factor de células pluripotenciales, y una citoquina.
- Tal como se indicó anteriormente, la composición farmacéutica puede comprender también uno o varios antígenos (o moléculas antigénicas) para un uso combinado, separado o secuencial. El antígeno puede ser cualquier péptido sintético o natural, una proteína recombinante, un producto de un patógeno matado, inactivado o atenuado, un microorganismo, un parásito, un lípido, etc., sus porciones y sus combinaciones. El antígeno puede ser una proteína completa, o cualquiera de sus porciones o fragmentos que contienen epitopos, en particular péptidos que son presentados al sistema inmunológico a través de moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II. El antígeno puede ser cualquier antígeno vírico, antígeno bacteriano, antígeno parasitario, antígeno tumoral, etc. Los ejemplos específicos de antígenos incluyen antígenos derivados de VIH, virus de varicella zoster, virus de la gripe, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simplex de tipo I o II, citomegalovirus humano, virus del dengue, virus de la hepatitis A, B, C, D o E, virus respiratorio sincitial, virus del papiloma humano, *Mycobacterium tuberculosis*, toxoplasma y clamidia.
- Un objeto concreto de esta invención se refiere a una composición que comprende una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, y una molécula antigénica, para un uso combinado, separado o secuencial. La composición puede comprender también uno o varios agentes inmunoestimulantes, según se describió anteriormente, para un uso combinado, separado o secuencial.
- Otro objeto concreto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente, en la que dicha composición farmacéutica se administra de modo simultáneo, unos pocos días antes, o de modo secuencial con una o varias moléculas antigénicas para obtener y/o estimular una respuesta inmunológica específica de antígeno en un sujeto.
- También se describe un método para provocar o potenciar una respuesta inmunológica específica de antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto dicho antígeno (o uno de sus fragmentos que contienen epitopos) y una composición de IL-7 hiperglicosilada según se describió anteriormente. La composición puede administrarse de

modo simultáneo, unos pocos días antes, o de modo secuencial, y más preferiblemente antes de dicho antígeno, para obtener y/o estimular una respuesta inmunológica específica de antígeno en un sujeto.

5 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende también un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse de cualquier sustancia, mezcla, soluto o composición que facilite o aumente la inmunogenicidad de un antígeno y que sea capaz de inducir una respuesta inmunológica de tipo Th1, tal como CpG, QS21, ISCOM y monofosforil lípido A. Estos adyuvantes son particularmente adecuados para producir y/o amplificar una respuesta inmunológica específica contra un antígeno o antígenos en sujetos mamíferos, en particular en seres humanos. El adyuvante preferiblemente se acondiciona y se administra por separado de la composición que contiene IL-7 y/o en un sitio de inyección distinto, preferiblemente con el antígeno o antígenos deseados.

10 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una composición de IL-7 hiperglicosilada humana según la invención mezclada con un diluyente, excipiente o vehículo adecuado, para la administración parenteral a un paciente humano para la estimulación profiláctica o terapéutica del desarrollo y proliferación de linfocitos B o T, o para aumentar una respuesta inmunológica. Las composiciones farmacéuticas de la invención inducen una estimulación de la linfopoyesis prolongada y/o respuestas inmunológicas amplificadas.

15 Una composición farmacéutica según la invención también puede utilizarse en un paciente humano para la estimulación profiláctica o terapéutica del desarrollo y proliferación de linfocitos B o T, para la potenciación de una inmunorreconstitución global y/o específica, o para la potenciación de respuestas inmunológicas humorales y/o celulares.

20 Una composición farmacéutica concreta según la invención es para su uso para prevenir o reducir las infecciones oportunistas en pacientes inmunodeficientes.

Otra composición farmacéutica concreta según la invención es para su uso para prolongar la estimulación de la linfopoyesis y/o para producir una respuesta inmunológica específica no sólo contra epitopos dominantes sino también contra epitopos subdominantes o menos inmunogénicos, epitopos que tienen una menor afinidad por el receptor de células T, que permitirá ampliar el repertorio de respuestas inmunológicas específicas en pacientes humanos.

25 La invención resulta particularmente adecuada para producir una respuesta inmunológica preventiva o curativa en sujetos, tales como pacientes inmunodeficientes, pacientes con cáncer, pacientes que han recibido injertos, pacientes infectados por un virus o un parásito, pacientes ancianos o cualquier paciente que tenga un recuento bajo de CD4, etc.

30 Los usos específicos y preferidos de los polipéptidos y las composiciones de IL-7 de esta invención incluyen el uso:

- como un potenciador de vacuna (la administración de dicha composición antes, durante o sustancialmente de modo simultáneo con la administración del antígeno) en una cantidad eficaz para inducir la potenciación de una respuesta inmunológica específica contra células malignas o agentes infecciosos; y

35 - para inducir la reconstitución inmunológica de pacientes cualquiera que sea su origen: infeccioso, radiaciones, transplantes (BMT, SCT), o fármacos.

40 Los polipéptidos y composiciones de IL-7 de esta invención pueden utilizarse por sí solos o en combinación con otros ingredientes activos, tales como factores linfopoyéticos que incluyen, sin limitación, SCF, Flt3-L, α -IFN, γ -IFN, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-15, IL-18 y/o IL-21. Cuando se emplea una terapia combinada, los diversos ingredientes pueden administrarse de modo simultáneo, por separado o de modo secuencial, y pueden acondicionarse juntos o por separado.

Los polipéptidos y composiciones de IL-7 de esta invención pueden utilizarse en diversas áreas, incluyendo la potenciación de vacunas en el campo de la salud animal, y para minimizar el número de administraciones de la sustancia activa.

45 También se describe un método para tratar una infección vírica, tal como una infección por VIH, hepatitis vírica, fiebre del Nilo occidental, dengue, comprendiendo dicho método administrar a un paciente infectado una composición de polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados.

50 En una realización concreta, el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra en asociación con una molécula de interferón. La molécula de interferón puede ser, por ejemplo, alfa-IFN (IFN de leucocitos), beta-IFN (IFN de fibroblastos), gamma-IFN (IFN inmunológico), omega-IFN o tau-IFN (factor trofoblástico).

También se describe un método para mejorar la recuperación timopoyética en un sujeto inmunocomprometido, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto inmunocomprometido una composición de polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados.

Preferiblemente, el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra en asociación con un factor del crecimiento de queratinocitos, un factor de células pluripotenciales, un antagonista de gonadotropina, o una hormona del crecimiento.

5 El polipéptido de IL-7 hiperglicosilado también puede utilizarse en un método para proporcionar una inmunización terapéutica contra células malignas, virus o bacterias, en el que el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra en asociación con un antígeno o una mezcla de antígenos, por ejemplo los descritos anteriormente. En esta situación, el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado también puede administrarse en asociación con GM-CSF.

10 También se describe un método para potenciar *ex vivo* la expansión de células T, comprendiendo dicho método poner en contacto células T con un polipéptido o composición de IL-7 hiperglicosilada, potenciando con ello la expansión de las células T. Este método es particularmente útil para preparar células T adecuadas para tratar pacientes con cáncer o una infección vírica mediante inmunoterapia adoptiva. La inmunoterapia adoptiva es una metodología *ex vivo* para la expansión selectiva de células T específicas que se dirigen a antígenos específicos (malignos o víricos). Esta técnica inmunoterapéutica en general incluye el aislamiento de linfocitos T específicos de Ag de sangre completa del paciente, la expansión *ex vivo* de estas células T utilizando los polipéptidos de IL-7, 15 opcionalmente la activación *ex vivo* de estas células T mediante otras citoquinas, y la administración al paciente. Son posibles otras técnicas. Los polipéptidos de IL-7 mejoran la supervivencia de estas poblaciones de células T que también muestran una actividad citotóxica potenciada.

Herramientas y métodos de producción

20 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar construcciones y métodos apropiados para producir las anteriores composiciones, en particular los anteriores polipéptidos, composiciones y sustancias farmacológicas de IL-7 hiperglicosilada, en cantidades y con calidad suficientes para su uso farmacéutico.

En particular, tal como se analizó anteriormente, la presente invención proporciona vectores, así como células hospedantes recombinantes, que pueden emplearse para producir polipéptidos de IL-7 humanos recombinantes de esta invención en diversas células hospedantes competentes, así como para fines de terapia génica.

25 El vector puede ser un plásmido, un virus, un fago, un cósmido, un episoma, etc. Los vectores preferidos son los vectores víricos (por ejemplo, adenovirus recombinantes) y los plásmidos, que pueden producirse basándose en esqueletos disponibles en el mercado, tales como pBR, pcDNA, pUC, pET, pVITRO, etc. El vector comprende generalmente secuencias o elementos reguladores para controlar o mediar en la expresión de un polipéptido de IL-7. Las secuencias reguladoras pueden elegirse de promotores, potenciadores, silenciadores, señales específicas de tejido, señales peptídicas, intrones, terminadores, secuencias de poliA, regiones GC, etc. o sus combinaciones. 30 Estos secuencias o elementos reguladores pueden derivarse de genes de mamífero, fúngicos, vegetales, bacterianos, de levaduras, de bacteriófagos, o víricos, o de fuentes artificiales. Los promotores útiles para la expresión procariota (tal como *E. coli*) incluyen el promotor de ARN polimerasa de T7 (pT7), el promotor de TAC (pTAC), el promotor de Trp, el promotor de Lac, el promotor de Tre, el promotor de PhoA, por ejemplo. Los promotores adecuados para la expresión en células de mamífero incluyen promotores víricos (por ejemplo, CMV, LTR, RSV, SV40, TK, pCAG, etc.), promotores de genes domésticos (por ejemplo, E1f α , β -actina de pollo, ubiquitina, INSM1, etc.), promotores híbridos (por ejemplo, actina/globina, etc.), etc. Un vector puede comprender más de un promotor. Los promotores pueden ser inducibles o regulados. Por ejemplo, el uso de promotores 35 inducibles o regulados permite un mejor control de la producción disociando el cultivo de las fases de producción. Pueden encontrarse promotores inducibles o regulados en la bibliografía, tales como el sistema de tetraciclina, el sistema Geneswitch, el sistema de ecdisona, el sistema de estradiol, el sistema RU486, el sistema de cumato, el promotor de metalotioneína, etc. Otros sistemas se basan en corrientes eléctricas o microondas, tales como el sistema de ultrasonidos enfocados, el sistema de expresión inducido por AIR, y similares. Estos sistemas pueden utilizarse para controlar la expresión de un polipéptido de IL-7 según la invención.

45 La IL-7 puede coexpresarse con un factor antiapoptótico (por ejemplo, iex, Bcl2, BclXL, etc.) o ciclina (es decir, p21, p27, etc.). Los ADNc que codifican dicha IL-7 y dicho factor antiapoptótico pueden colocarse cadena abajo del mismo promotor, pero separados por una secuencia IRES, o cada uno de ellos cadena abajo de su propio promotor.

50 El vector también puede comprender un origen de la replicación y/o un gen marcador, que puede seleccionarse a partir de secuencias convencionales. Puede insertarse un marcador de selección de la amplificación, tal como un gen DHFR, en el esqueleto del vector.

El vector puede comprender también diversas combinaciones de estos diferentes elementos, que pueden organizarse de diferentes maneras.

55 La presente invención también proporciona células hospedantes recombinantes que comprenden un ácido nucleico o un vector según se describió anteriormente. La célula hospedante puede seleccionarse de cualquier célula eucariota y procariota, generalmente de una célula de mamífero (en particular una célula humana, de roedor, canina), una célula bacteriana (en particular *E. coli*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*), una célula de levadura, una célula vegetal y una célula de insecto. Estas células hospedantes pueden adaptarse a un medio exento de suero. La

producción también puede lograrse en un animal o planta transgénico.

Las células hospedantes recombinantes preferidas se seleccionan de células de mamífero, en particular de células humanas, así como sus derivados o mutantes.

5 Los ejemplos específicos de células hospedantes adecuadas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón embrionario humano (HEK-293), queratinocitos epidérmicos humanos (HEK), células estromáticas o epiteliales humanas, PERC6, etc. En estas células de mamífero, la IL-7 puede producirse como una proteína segregada utilizando secuencias de péptidos señal funcionales.

10 Un objeto específico de esta invención es una célula hospedante eucariota que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:2, 4 ó 6.

15 Otro objeto de la presente invención se refiere a procesos que pueden utilizarse, a escala industrial, para la producción de un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado sustancialmente puro, de calidad farmacéutica, según se describió anteriormente. El proceso conduce a altos rendimientos de un conformero de IL-7 recombinante adecuado para un uso terapéutico. La invención también proporciona nuevos métodos para controlar composiciones que contienen IL-7 para determinar la presencia de una cantidad de polipéptido de IL-7 hiperglicosilado, según se describió anteriormente.

En un aspecto concreto, el método para producir polipéptidos o composiciones de IL-7 hiperglicosilada, según se definió anteriormente, comprende:

- a) cultivar una célula hospedante recombinante, según se describió anteriormente, y
- 20 b) recoger un polipéptido de IL-7 producido por dichas células.

La muestra puede someterse a diversos tratamiento o condiciones para aumentar la pureza de IL-7, para eliminar residuos celulares o partículas víricas, etc. Los ejemplos típicos de dichos tratamientos incluyen centrifugación, aclaramiento y/o dia-ultra-nano-filtración. Por tanto, la muestra puede enriquecerse para el polipéptido de IL-7.

25 Para aumentar los rendimientos o la eficacia del método, resulta muy deseable producir una muestra que contenga o que esté enriquecida en polipéptidos de IL-7 glicosilados y plegados correctamente.

30 El polipéptido de IL-7 hiperglicosilado puede purificarse mediante diferentes técnicas conocidas *per se*, pero que no han utilizado hasta la fecha en la presente combinación para producir un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado. Estas técnicas se seleccionan, más preferiblemente, de una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía de afinidad y una cromatografía de filtración en gel, por sí solas o en diversas combinaciones. Estos métodos permiten la eliminación del ADN de la célula hospedante y otras impurezas que disminuirían la recuperación. En una realización preferida, la etapa ii) comprende una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba. Esta cromatografía puede realizarse utilizando diversos soportes y formatos, preferiblemente utilizando HIC-butilo. La etapa ii) puede realizarse en cualquier soporte, preferiblemente de modo discontinuo o en columna utilizando un gel apropiado.

35 En una realización preferida, la etapa de purificación comprende cargar la muestra a través de una columna cargada con un gel específico (por ejemplo, Sephadex).

En otra realización preferida, la etapa de purificación comprende una etapa de abrillantamiento que implica cargar la muestra a través de una columna cargada con un gel específico (Source 15S) para concentrar la proteína de interés recuperada y eliminar los posibles contaminantes de proteínas residuales.

40 En otra realización concreta, la etapa de purificación comprende cargar la muestra a través de una columna cargada con un gel específico que comprende un anticuerpo monoclonal anti-IL-7 inmovilizado sobre una resina (sulfato de dextrano o heparina, por ejemplo).

45 Estos métodos permiten la producción reproducible y eficaz de un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado sustancialmente puro, según se describió anteriormente. Los métodos son particularmente ventajosos, puesto que la IL-7 recombinante puede obtenerse con una pureza de al menos 95% en peso, preferiblemente al menos 98% en peso, y aún más preferiblemente al menos 99% o incluso 99,5% en peso con respecto a la cantidad total de IL-7.

50 Cada etapa del proceso descrito anteriormente puede controlarse mediante métodos analíticos, incluyendo un análisis de SDS-PAGE. La estructura primaria de la IL-7 optimizada puede controlarse y caracterizarse determinando el gen y/o la secuencia de aminoácidos, mediante análisis de cartografiado peptídico, después de una digestión tripsica, determinando el peso molecular con SDS-PAGE, HPLC de exclusión molecular, espectrometría de masas, tal como MALDI-TOF o electropulverización o similares, determinando la hidrofobicidad con una HPLC en fase inversa, por ejemplo, y/o determinando la carga eléctrica con una cromatografía HPLC de intercambio catiónico o análisis de isoelectroenfoque, por ejemplo.

Otra realización de la invención se refiere a métodos de producción de IL-7, según se describió anteriormente, en los que la expresión de IL-7 por células hospedantes recombinantes es inducible, está regulada o es transitoria, de forma que las fases de cultivo celular y de expresión de IL-7 pueden disociarse. Más en concreto, en una realización específica, la expresión de IL-7 puede reprimirse o minimizarse durante el crecimiento, la expansión y/o el cultivo de las células recombinantes, para permitir la producción de grandes cantidades de células hospedantes recombinantes sin efectos tóxicos potenciales mediados por IL-7. Entonces puede inducirse la expresión de IL-7 dentro del cultivo celular (o en una muestra de éste), permitiendo la síntesis eficaz y la liberación de la IL-7 recombinante.

Por tanto, un objeto de esta invención también se refiere a un método para producir un polipéptido de IL-7 recombinante, que comprende cultivar una célula hospedante recombinante según se describió anteriormente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de IL-7, y recuperar el polipéptido de IL-7 recombinante producido, en el que dicha molécula de ácido nucleico proporciona una expresión regulada o inducible de dicho polipéptido de IL-7, de forma que la expresión de dicho polipéptido de IL-7 puede reprimirse o minimizarse durante el crecimiento de las células recombinantes e inducirse durante la fase de producción. El ácido nucleico generalmente comprende un promotor inducible, que puede reprimirse o activarse en presencia o en ausencia de un agente específico contenido o añadido al medio de cultivo. El método resulta particularmente adecuado para producir un confórmero de IL-7 hiperglicosilado según se describió anteriormente.

En la técnica se han descrito diversos sistemas de expresión regulada o inducible, que son funcionales en células hospedantes de mamífero y que pueden utilizarse en la presente invención. Éstos incluyen el sistema de tetraciclina TetOn/Off, el sistema Geneswitch (Invitrogen) con mifepristona como agente inducible y el promotor GAL4-E1b, el sistema de ecdisona (inducción con ponasterona A o muristerona A, análogos de hormonas esteroideas de insecto) (Invitrogen), promotor de metalotioneína (inducible por el cinc), sistema de estradiol, sistema RU486, sistema de ultrasonidos enfocados, sistema de expresión inducido por AIR (regulación inducible por acetaldehído), sistema de cumato (Q-mate, Qbiogen), sistema Cre-Lox, etc. Estos sistemas de expresión regulados o inducibles pueden utilizarse en diversas células tales como, por ejemplo, las líneas celulares HEK293, HEK293 EBNA, HEK, T-REXTM-293, T-REXTM-HeLa, T-REXTM-CHO o T-REXTM-Jurkat, transformadas con un vector recombinante diseñado para expresar la IL-7 después de una inducción.

Como alternativa, puede utilizarse la transfección transitoria para disociar la expansión celular de la producción de IL-7. A este respecto, se utilizan vectores de transporte de genes eficaces para introducir una secuencia codificadora de IL-7 en células tras su expansión. Más preferiblemente, el sistema de vector para la transfección transitoria es un vector vírico, tal como un adenovirus recombinante o un vector episómico (por ejemplo, pCEPH (Invitrogen), pTT (IRB; Durocher, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res., 2002, 30(2)) o utilizando secuencias MAR). Los adenovirus (y otros vectores víricos, tales como AAV, por ejemplo) pueden producirse según técnicas conocidas en la técnica. Generalmente, se producen adenovirus E1-defectuosos en una línea celular que complementa E1, tal como células HEK293, PERC6, etc. Estos procesos de transfección transitoria pueden aplicarse en diversas células de mamífero en cultivo, tales como células transformadas A549, HeLa, VERO, BHK o CHO, por ejemplo (tal como se describe en el ejemplo A4). Un método de expresión transitoria alternativo adecuado para su uso en la presente invención se describe, por ejemplo, en el siguiente artículo: Durocher, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res., 2002, 30(2), en células HEK293 EBNA o HEK293.

En una realización preferida, los métodos de producción de esta invención comprenden otra etapa c) de caracterización y medición o cuantificación del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado concreto, según se describió anteriormente, contenido en el producto resultante. La caracterización física y biológica del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado deseado puede obtenerse mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF o electropulverización), espectroscopía de infrarrojos, resonancia magnética nuclear (RMN), mediante la determinación del diámetro circular, mediante la evaluación de la actividad biológica de IL-7 en un bioensayo específico, mediante la medición de la afinidad hacia un anticuerpo monoclonal específico generado contra dicho polipéptido de IL-7 hiperglicosilado, o una HPLC de afinidad de heparina. Una vez caracterizado, puede realizarse la cuantificación de dicho confórmero mediante ELISA, bioensayo, afinidad de dicho polipéptido de IL-7 hiperglicosilado por el receptor de IL-7, y cualquier método de cuantificación de proteínas que pueda aplicarse al confórmero aislado.

A este respecto, la invención también proporciona y se refiere a un método para identificar y/o medir la cantidad del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado y/o las impurezas relacionadas en una muestra, en particular en una preparación farmacéutica. Estos métodos de caracterización pueden utilizarse para caracterizar y clasificar inicialmente la proteína para clasificar un uso terapéutico, en controles de calidad de lotes farmacéuticos. La invención propone, por primera vez, un método para caracterizar y controlar preparaciones que contienen IL-7, para determinar la presencia y/o cantidad relativa de polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de esta invención. Los métodos preferidos emplean el ensayo de proteínas del ácido bicinefónico (BCA), SDS-PAGE, transferencia Western, HPLC de exclusión molecular, HPLC en fase inversa, HPLC de intercambio iónico, HPLC de interacción hidrófoba, ensayo de aminoácidos (AAA), isoelectroenfoque (IEF), ELISA, absorción de UV y/o un bioensayo. Estos métodos pueden realizarse por sí solos o en diversas combinaciones.

La invención también proporciona un método para producir una sustancia farmacológica o una composición farmacéutica de IL-7, comprendiendo dicho método (i) cultivar una célula hospedante recombinante que codifica un

- polipéptido de IL-7, (ii) aislar dicho polipéptido recombinante para producir una sustancia farmacológica de IL-7, y (iii) acondicionar dicha sustancia farmacológica de IL-7 para producir una composición farmacéutica adecuada para un uso terapéutico o de vacuna, comprendiendo dicho método además una etapa de identificación, caracterización o medición, en dicha sustancia farmacológica o composición farmacéutica, de la cantidad y/o la calidad del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado según se definió anteriormente y, más preferiblemente, una etapa de seleccionar la sustancia farmacológica o la composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, más de aproximadamente 90%, preferiblemente 95%, más preferiblemente 98% de dicho polipéptido de IL-7 hiperglicosilado.
- La etapa de caracterización puede realizarse mediante una diversidad de técnicas, más preferiblemente mediante métodos relacionados con la espectrometría de masas, con o sin digestión trípica, cromatografía de afinidad de lectina, ensayo de aminoácidos (AAA), digestiones con endo- y exo-N- y -O-glicanasa (PNGasa A/F, O-glicosidasa, neuraminidasa), electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos, espectrometría de masas MALDI-TOF o de electropulverización, análisis de anticuerpos monoclonales específicos para puentes disulfuro y/o caracterización de la conformación. La identificación de variantes moleculares e impurezas relacionadas con el producto se realiza preferiblemente utilizando uno o varios métodos seleccionados de electroforesis bidimensional, enfoque isoelectrico y cromatografía de intercambio iónico para las formas desamidadas, cromatografía de exclusión molecular y análisis de SDS-PAGE para las formas multiméricas, y HPLC en fase inversa con o sin predigestión enzimática para las formas truncadas.
- La etapa resulta particularmente adecuada para el control de calidad de composiciones clínicas o farmacéuticas, en las que sólo las composiciones que comprendan más de aproximadamente 95% del anterior polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se conservan, preferiblemente más de aproximadamente 96%, 98% o 99,5%. Todos estos polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados muestran un punto isoelectrico medio menor que 6,5.
- Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado recombinante obtenido mediante los procesos descritos anteriormente, para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada con una inmunodeficiencia, en particular para inducir una estimulación de la linfopoyesis prolongada, para provocar y/o amplificar una respuesta inmunológica, en particular una respuesta inmunológica específica de antígeno.
- Otro objeto de la invención se refiere al uso de un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado como herramienta para un uso experimental y farmacológico en mamíferos para aplicaciones veterinarias.
- Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en los siguientes ejemplos, que deben considerarse ilustrativos y no limitantes del alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo A: Construcción y expresión de secuencias de nucleótidos que codifican la IL-7 humana (h) y de simio (s) optimizadas en células de mamífero

A1. Construcción de una secuencia de nucleótidos que codifican la IL-7 humana optimizada

1.1. Optimización de la señal peptídica

Puesto que la expresión de fragmentos de ADNc de IL-7 unidos al extremo 5' de la señal peptídica de IL-7 natural es muy baja, los inventores ensayaron varias secuencias de péptidos señal.

- Las nuevas secuencias de ADNc que codifican la IL-7 humana se obtuvieron químicamente de oligonucleótidos sintéticos ensamblados.

Se ensayaron varias secuencias de péptidos señal: el péptido señal (SP) de proteínas altamente segregadas (Barash *et al.*, 2002, Biochemical and Biophysical Research Communications, 294:835-841):

SP de IL-7

MFHVSFRYIF GLPPLILVLL PVASS (SEQ ID NO:13);

- SP de EPO

MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLG (SEQ ID NO:14);

SP de SEAP

MLLLLLLLGL RLQLSLG (SEQ ID NO:15);

SP de IgGkappa

METDTLLLWV LLLWVPGSTG (SEQ ID NO:16);

SP de lactotransferrina/vitronectina

MKLVFLVLLF LGALGVALA (SEQ ID NO:17);

SP de cistatina-bis

5 MARPLCTLLL LMATLAVALA (SEQ ID NO:18);

SP de un nuevo híbrido de EPO/IL-7

MGVHECPAWL WLLLSLLSLV LLPVAS (SEQ ID NO:19).

Las secuencias de ADNc obtenidas se insertaron en el vector pTT5 (Durocher *et al.*, 2002, Nucl. Ac. Res., 30) para la expresión transitoria en células de mamífero, tales como células HEK293, células CHO.

10 Para comprobar que el péptido señal se haya escindido correctamente, se determinó el aminoácido N-terminal para cada proteína obtenida; se mantuvo la integridad de la IL-7.

Parece que las mejores secuencias de péptido señal eran las de la cistatina, IgG, EPO y el híbrido EP/7. En efecto, la expresión de IL-7 se potencia en al menos un factor de 10.

1.2. Optimización de la secuencia de nucleótidos que codifica la IL-7 humana

15 Manteniendo la secuencia de aminoácidos de EP/7hIL-7, se optimizó la secuencia del ácido nucleico mediante:

- la eliminación de los codones raros humanos (utilizando un programa informático analizador de la utilización de codones gráfico),

- la potenciación de la estabilidad del ARNm potenciando el contenido en "GC" de la secuencia, excepto para la secuencia del péptido señal (Kim *et al.*, 1997, Gene, 199), y minimizando la sucesión de dinucleótidos "CA".

20 La secuencia se muestra en SEQ ID NO:2.

A2. Construcción de una secuencia de nucleótidos que codifica la IL-7 de simio optimizada

Tal como se describe para la secuencia codificadora de IL-7 humana, se sintetizó una secuencia optimizada de EP/7-sIL-7 (SEQ ID NO:3).

A3. Construcción de una secuencia de nucleótidos que codifica la IL-7 canina

25 Se amplificó ADNc de IL-7 canina mediante PCR a partir de un banco de ADNc de riñón de perro (Biochain), se clonó y se secuenció como se describió anteriormente para la secuencia codificadora de IL-7 humana, y se sintetizó una secuencia de IL-7SP o EP/7SP-clIL-7 (SEQ ID NO:6).

A4. Expresión en mamíferos (expresión en células BHK, o expresión en células CHO, o expresión en células HEK-293)

30 Las secuencias de ADNc que codifican IL-7 se amplificaron mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1987, Methods in Enzymology, 155:335-350) para crear sitios de restricción (*NotI/SwaI*) para clonar en el vector de expresión.

35 El sistema de expresión ph-pgk.EP7-hIL-7 (figura 1) o pBh-pgk.EP7-hIL-7 (figura 2) se diseñó para que expresase una proteína de IL-7 predicha a partir de la traducción de la secuencia del gen de la IL-7 humana natural. La selección de las células que contenían el vector recombinante se realizó basándose en los genes marcadores de resistencia a antibióticos (ampicilina para clonar en *E. coli*, e higromicina para la expresión en células de mamífero) que porta el vector.

Este vector de expresión ha sido construido íntegramente en CYTHERIS, comenzando a partir del plásmido pIC20H (ATCC) que confiere resistencia a la ampicilina al sistema. Contiene dos unidades de producción de mamífero:

40 1) una para la expresión de las secuencias codificadoras de IL-7, bajo el control del promotor pgk, y una secuencia de poliA sintética que evita la transcripción a través del promotor pgk,

2) otra para la expresión de la resistencia a la higromicina, bajo el control del "potenciador de sv40-promotor tk".

Se insertaron las siguientes secuencias en este vector preliminar:

- "hpf-ef1a pA": fragmento *HindIII/SbfI* de pVtro2.mcs (Invitrogen);

- promotor tk: fragmento de PCR *EcoRI/HindIII* de pMEP4 (Invitrogen);
- potenciador de sv40: fragmento de PCR *BssHII/EcoRI* de pViro2.mcs (Invitrogen);
- MAR de β -globina de conejo. una "región de unión a la matriz" putativa para una mejor integración en la región altamente transcrita de la cromatina, fragmento de PCR *EcoRV/Agel* del intrón-2 de β -globina de conejo de pSG5 (Stratagene);
- SpA: fragmento *StuI/BspEI* de pCAT3 control (Promega);
- promotor pgk: fragmento de PCR *KpnI/BssHII* de pQBI.pgk (Q-biogen);
- 5'UTRint1: fragmento *HindIII* de un intrón quimérico de pCAT3-control (Promega);
- *NotI/SwaI* o *NotI/PmlI* de ADNc codifica IL-7 y mutantes;

10 - hghpA: *Nrul/SwaI* de síntesis sintética a partir de la secuencia de ADNc de la hormona del crecimiento humana descrita por M. Goodman (DeNoto *et al.*, 1981, Nucl. Acid. Res., 9(51):3719-3730).

Se prepararon algunos variantes del vector con otros promotores de IL-7 distintos del promotor pgk: Ef1alfa, ARNsn U1, actina, ubiquitina, promotores de CMV, etc. u otro marcador de selección (neomicina, etc.).

15 El vector de expresión de mamífero (HEK-293, CHO o BHK) que comprende SEQ ID NO:2 se denomina ph-pgk.EP7-hIL-7 o pBh-pgk.EP7-hIL-7. Se logró la expresión estable de la IL-7 humana en células transfectadas HEK-293 o CHO utilizando el vector de expresión ph-pgk.EP7-hIL-7 o pBh-pgk.EP7-hIL-7. Después de la linealización con *NdeI*, el vector de expresión ph-pgk.EP7-hIL-7 o pBh-pgk.EP7-hIL-7 se transfectó en las células hospedantes de mamífero utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. El marcador seleccionable utilizado para establecer los transformantes estables fue la higromicina (Invitrogen).

20 **A5. Expresión inducible en mamíferos (promotor de metalotioneína "MT1")**

En el mismo vector de expresión, el promotor pkg también se reemplazó por una secuencia "MT1 de *Mus musculus*" *BspEI/BssHII* sintetizada químicamente, según se indica en PubMed (nº X53530) (Carter *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7392-7396).

25 MT1 es un promotor del factor de transcripción dependiente de metales. Así, la expresión de clones estables depende del cinc.

A6. Coexpresión en mamífero de IL-7 y Bcl2 o BclXL (expresión en células BHK, o expresión en células CHO, o expresión en células HEK-293)

30 Para potenciar la viabilidad celular en un cultivo de células hospedantes de mamífero y, por tanto, para optimizar las cantidades de producción de IL-7, se preparó un variante de un plásmido de expresión insertando una secuencia de ADNc de Bcl2 entre el promotor tk y el ADNc de hph, de forma que la acción antiapoptótica de Bcl2 pueda ensayarse en una producción en un biorreactor (Zhong *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:4533-4537; Lee *et al.*, 2000, Journal of Cell Science, 114(4):677-684) (véase la figura 2).

Ejemplo B: Construcción y expresión de análogos hiperglicosilados de secuencias de nucleótidos codificadoras de IL-7 en células de mamífero

35 **B1. Construcción de secuencias de ADNc de análogos de IL-7 hiperglicosilados**

40 Los análogos de IL-7 hiperglicosilados se obtuvieron utilizando varias técnicas que incluyen métodos de mutagénesis. Los análogos de IL-7 hiperglicosilados (como alternativa: HG37 -40 -104 -126 y -147) se construyeron a partir de oligonucleótidos sintéticos ensamblados. Se obtuvieron varios análogos introduciendo una o más mutaciones deseadas para producir análogos de IL-7 que tienen uno o más sitios de glicosilación adicionales. Por tanto, la secuencia de ADNc de longitud completa resultante que contiene uno o múltiples sitios de glicosilación adicionales deseados se insertó, después de una digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *PmlI*, entre los sitios de restricción *NotI/PmlI* para la clonación directa en el vector de expresión (similar a la figura 1 ó 2 pero que contiene la secuencia de IL-7 apropiada).

B2. Expresión de secuencias de ADNc de análogos de IL-7 hiperglicosilados

45 La expresión de análogos de IL-7 hiperglicosilados se realizó como se describió anteriormente en las secciones A4 a A6.

Ejemplo C: Producción de hIL-7 recombinante en condiciones de cultivo en un biorreactor

El mejor clon positivo estable, como en el ejemplo A4, se adaptó a un cultivo en suspensión exento de suero

mediante varias selecciones de medios y componentes para producir un clon optimizado para la productividad y el crecimiento en un cultivo de alta densidad celular. Antes de sembrar el biorreactor de 100 a 2000 l, se realizaron los precultivos en el sistema de "bolsa de ondas". El cultivo celular se realiza en un biorreactor de 100 a 2000 litros con un sistema de perfusión o un sistema de alimentación discontinua durante 10 a 15 días. Las células se amplificaron hasta una concentración de 10 millones de células/ml en un medio con bajo contenido en glutamina suplementado con peptonas vegetales.

En una primera etapa de expansión, la temperatura del cultivo se regula a 37 °C para aumentar la densidad celular. Después de unos cuantos días, la temperatura disminuyó a aproximadamente 28/32 °C para inhibir el crecimiento celular y permitir un mejor nivel de expresión. Además, la disminución de la temperatura disminuye la velocidad de la vía de secreción, favoreciendo una mejor glicosilación de la IL-7 expresada con mayor ocupación de sitios.

Unos cuantos días antes de finalizar el cultivo se intensificó la expresión de IL-7 mediante la adición de biturato de sodio 0,5-10 mM al medio.

Bajo las condiciones descritas anteriormente, la expresión de IL-7 se controló dentro de las células y en el medio de cultivo (figura 3).

Para producir glicoformas de IL-7 de alto peso molecular, se mantuvieron en el medio glucosa 3 g/l y glutamina 3 mM durante el cultivo, así como una buena oxigenación. También se controló el consumo de aminoácidos y al cultivo se le administran menos aminoácidos. El cultivo celular se recolecta en cuanto la viabilidad celular disminuye por debajo del 90%.

Ejemplo D: Purificación del producto de IL-7 humana recombinante expresado en células HEK-293 y CHO

Se recogió el medio de cultivo celular bruto y se centrifugó para sedimentar las células completas y los residuos celulares. Como alternativa, esto puede lograrse mediante una filtración en profundidad con módulos o cápsulas de aclaramiento, tales como cápsulas Mustang XT (Pall), Sartoclear P (Sartorius), Millistak+ Opticap (Millipore), o cartuchos de fibra huecos (AXH flujo cruzado 10 (GE)) o equivalentes. El medio de cultivo centrifugado se concentró aproximadamente 10 veces con un aparato de módulos Centrasette, con un límite de exclusión molecular de 10 kDa (Pall Life Sciences) para reducir el volumen del sobrenadante. También puede emplearse cualquier otro sistema de filtración/concentración con porosidad similar.

El sobrenadante concentrado se centrifugó, se ajustó a pH 7,5 y se aplicó a una columna Q Sepharose Fast Flow (General Electric Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5. La proteína entonces se recuperó en el flujo. Durante esta etapa cromatográfica negativa se eliminaron diversos contaminantes, entre ellos el ADN. Una alternativa a esta etapa es utilizar los módulos de membrana convalidados Mustang Q (Pall) en condiciones similares, para un mejor rendimiento y/o un proceso ligeramente más rápido. Otra alternativa a esta etapa es capturar la proteína sobre una resina de intercambio aniónico fuerte (Q Ceramic Hyper D (Biosepra), Capto Q (GE)) o membrana (Sartobind Q, Sartorius).

Después de esta etapa de purificación, se realizó una etapa de captura sobre una resina de intercambio catiónico fuerte. El flujo recogido al final de la etapa previa se cargó sobre una columna Fractogel EMD SO₃⁻ (Merck) equilibrada con tampón de carga (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5) y se lavó con fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5. La elución se realizó utilizando un gradiente de NaCl lineal (15 volúmenes de columna) en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5.

Las fracciones activas se reunieron y se inactivaron durante 30 minutos a pH 3,5 a temperatura ambiente para eliminar los virus. Una alternativa a este proceso es reemplazar esta etapa de inactivación vírica por una nanofiltración en múltiples capas al final del proceso. Después de la inactivación vírica, las fracciones de proteínas reunidas se diluyeron en 2 veces en tampón (fosfato de sodio 200 mM, pH 7, sulfato de amonio 3 M) y el pH se ajustó a 7. Entonces la disolución de proteínas se cargó sobre una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de butil-Toyopearl 650-M (Tosoh) equilibrada con el tampón de carga (fosfato de sodio 50 mM, pH 7 + sulfato de amonio 1,5 M). Después de lavar con el tampón de carga, la IL-7 eluyó con 25 volúmenes de columna de un gradiente salino que variaba de sulfato de amonio 1,5 M a 0 M en fosfato de sodio 50 mM, pH 7.

Como alternativa, puede utilizarse una resina HIC, tal como hexil-Toyopearl 650-M (Tosoh), butil/octil-Sepharose™ 4 Fast Flow (General Electric Healthcare) para esta etapa. Otra alternativa a HIC para fines de transformación de escala es utilizar otra matriz, tal como MEP HyperCal (Pall Biosepra) para resultados similares.

La combinación de la etapa de captura mencionada anteriormente y la cromatografía de interacción hidrófoba permite la separación óptima de las diferentes isoformas de IL-7 glicosiladas (de B1 a B10, tal como se indica en la figura 4), según sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas. La selección adecuada de las fracciones de elución (fracción B1 a B4) conduce a un enriquecimiento en la entidad de hIL-7 3N-glicosilada asociada o no a 1O-glicosilación.

Las fracciones de IL-7 muy glicosiladas se reunieron y se cargaron sobre una columna de G25 Sephadex (General

Electric Healthcare) con un tampón de salinidad baja (acetato de sodio 20 mM, pH 6). Una alternativa a esta etapa es diafiltrar el agrupamiento de proteínas de alta salinidad utilizando membranas de TFF de límite de exclusión molecular de 5 ó 10 KDa (membranas Quick Start (GE), Centrimate TFF (Pall)). Las fracciones de proteínas obtenidas en la etapa G25 se cargaron en una columna Source 15S (General Electric Healthcare) equilibrada con el tampón de carga (acetato de sodio 20 mM, pH 6). Esta etapa de abrillantamiento dio como resultado la concentración de las proteínas y la eliminación de los contaminantes residuales. La columna se lavó con tampón de carga de acetato de sodio, y la proteína de IL-7 eluyó con 15 volúmenes de columna de un gradiente salino que varía de NaCl 0 a 1 M en acetato de sodio 20 mM, pH 6. Las fracciones eluidas se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie o nitrato de plata. Sólo las fracciones que contenían IL-7 se reunieron para liberar el lote de proteína de IL-7 purificada final.

Si no se ha realizado previamente la inactivación vírica, el proceso de purificación también puede incluir una combinación adicional de dos filtraciones para garantizar una óptima eliminación vírica. La eliminación vírica puede realizarse mediante filtración utilizando un dispositivo de prefiltración (Planova 75, Asahi Kasei Medical), seguido de membranas de celulosa nanoporosa (Planova 20N, Asahi Kasei Medical) o de otras membranas de eliminación vírica (Virosart, Sartorius; DV20, Millipore).

En la figura 5 se muestran SDS-PAGE de hIL-7 glicosilada e hiperglicosilada purificada de *E. coli*. Los desplazamientos en el gel ilustran el nivel de glicosilación de la proteína. En efecto, las formas hiperglicosiladas ensayadas en este caso (HG-37-147 y HG-40-104) tienen un peso molecular mayor que la hIL-7 totalmente glicosilada.

Ejemplo E: Análisis de los carbohidratos de las glicoproteínas

La producción de IL-7 humana recombinante se realizó en un sistema de expresión basado en células CHO, pero no se limita a éste por las siguientes razones. Las células CHO son el hospedante más habitual y más convalidado en la actualidad utilizado para la producción de glicoproteínas terapéuticas humanas recombinantes. Además, una gran cantidad de trabajos detallados indican que las células CHO, incluyendo las líneas celulares CHO modificadas genéticamente que expresen la sialil- α -1-6 transferasa, son capaces de glicosilar proteínas recombinantes de una manera cualitativamente similar a la observada en células humanas. Esta característica concreta tiene una importancia capital para reducir la inmunogenicidad potencial de la glicoproteína recombinante cuando se inyecta en pacientes humanos.

El producto de IL-7 humano recombinante purificado o las fracciones enriquecidas para glicoformas concretas (3N o 3N+2N, asociadas o no a un resto O-glicano) obtenidos a partir de células CHO transfectadas se analizaron mediante una transferencia Western para confirmar el estado de glicosilación en comparación con IL-7 humana recombinante derivada de *E. coli*. Las diferentes glicoformas de la IL-7 purificadas y producidas en CHO se caracterizaron diferencialmente utilizando una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los pesos moleculares aparentes de las entidades de glicoproteínas variaban entre 20 kDa y 35 kDa con una banda principal a aproximadamente 27 kDa (observada en SDS-PAGE, véanse las figuras 5 y 6), que se corresponde muy probablemente con una forma con tres N-glicosilaciones que comprende o no un resto O-glicano. Este aspecto se aborda específicamente mediante una desglicosilación enzimática del producto purificado (figura 7).

Estas glicoformas (3N o 3N+2N, asociadas o no a un resto O-glicano) de la IL-7 purificada y producida en CHO se caracterizaron diferencialmente utilizando la espectrometría de masas, dando una masa molecular mayor que 25 kDa para la 3N-glicoforma asociada o no a un resto O-glicano, y mayor que 23 kDa para la 2N-glicoforma asociada o no a un resto O-glicano (véase la figura 8). Además, las anteriores formas glicosiladas presentan un punto isoeléctrico medio de 5,8, lo cual refleja un perfil de alta sialilación (véase la figura 9).

Como comparación, un análisis similar con hIL-7 derivada de *E. coli* no glicosilada produjo una proteína con un peso molecular aparente a aproximadamente 18 kDa, y la hIL-7 hiperglicosilada derivada de mamífero mostró un peso molecular aparente entre 27 y 37 kDa.

Se evaluó la complejidad de glicosilación general y la heterogeneidad de N-glicanos total de la hIL-7 derivada de CHO purificada mediante una desglicosilación total enzimática, seguido de una separación cromatográfica y un análisis de espectrometría de masas de los oligosacáridos generados. Las muestras de hIL-7 glicosilada purificada se digirieron enzimáticamente con una endoglicosidasa, tal como péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F, Roche). Los oligosacáridos N-enlazados liberados se separaron de la estructura peptídica y se clasificaron utilizando una columna de grafito Carbohydrate de 200-300 μ l (Alltech), seguido de una espectrometría de masas MALDI-TOF (Voyager Spec, Applied Biosystems). Los valores de m/z correspondientes a cada pico del espectro de MS permitieron la identificación de la estructura general de N-glicanos de la molécula de hIL-7 completa.

Para la detección específica de los glicanos que contienen ácido siálico se realizó una carboximetilación de los oligosacáridos generados con PNGasa (según se indica en Powell, A.K., y Harvey, D.J., Rap. Com. Mass Spec., 1996), antes de los análisis de espectrometría de masas.

El análisis de los espectros generados a partir de hIL-7 derivada de CHO purificada revelaron unas masas de N-

glicanos que variaban de 1340 Da hasta 3516 Da (véase la figura 10).

A partir del espectro puede determinarse la siguiente estructura de glicanos (véase la tabla 3).

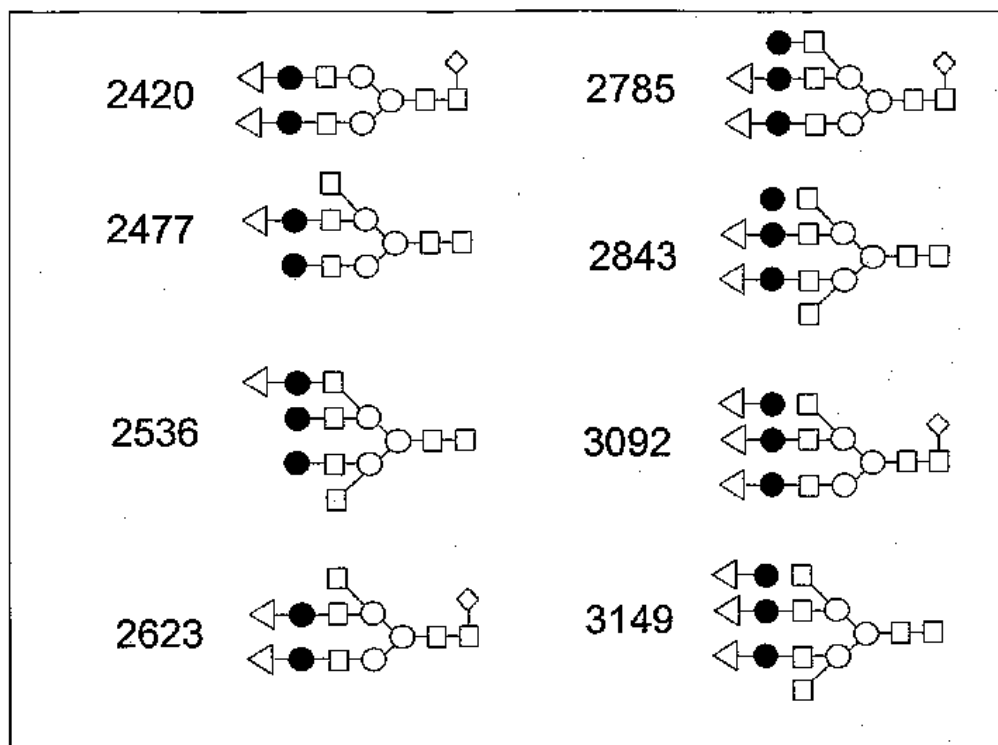
Tabla 3

Señal m/z	Asignación de los iones moleculares observados
1338	Hex ₃ HexNAC ₄ + Na ⁺
1448	Hex ₄ (dHex)HexNAC ₄ + Na ⁺
1485	Hex ₃ (dHex)HexNAC ₄ + Na ⁺
1647	Hex ₄ (dHex)HexNAC ₄ + Na ⁺
1809	Hex ₅ (dHex)HexNAC ₄ + Na ⁺
1824	Hex ₃ (dHex ₂)HexNAC ₅ + Na ⁺
1970	Hex ₅ (dHex)HexNAC ₄ (Sulf) ₂ + 2Na ⁺
2012	Hex ₅ (dHex)HexNAC ₅ + Na ⁺
2157	NeuAcCarboxiHex ₄ (dHex)HexNAC ₅ + Na ⁺
2182	NeuAcHex ₅ (dHex)HexNAC ₄ Sulf + Na ⁺
2318	NeuAcCarboxiHex ₅ (dHex)HexNAC ₅ + Na ⁺
2421	Hex ₃ (dHex)HexNAC ₈ (Sulf) + Na ⁺
2536	NeuAcCarboxiHex ₆ HexNAC ₆ + Na ⁺
2624	NeuAc2CarboxiHex ₅ (dHex)HexNAC ₅ + Na ⁺
2786	NeuAc2CarboxiHex ₆ (dHex)HexNAC ₅ + Na ⁺
2843	NeuAc2CarboxiHex ₆ HexNAC ₆ + Na ⁺
3092	NeuAc3CarboxiHex ₆ (dHex)HexNAC ₅ + Na ⁺
3153	NeuAc3CarboxiHex ₆ HexNAC ₆ + Na ⁺

- 5 Hex: hexosa (galactosa o manosa), HexNAC: N-acetilhexosamina (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dHex: desoxihexosa (fucosa), Sulf: grupo sulfato, NeuAc: ácido N-acetilneuramínico.

Teniendo en cuenta i) las respectivas masas de los restos oligosacáridos observados, ii) la masa de cada monosacárido, y iii) las leyes de las vías de biosíntesis de glicanos tal como se conocen en la actualidad, pueden suponerse las siguientes estructuras de N-glicanos muy complejas, con una buena probabilidad.

- 10 Tabla 4: N-glicanos de mamífero complejos bi- y triantenarios caracterizados en hIL-7 derivada de CHO (pero no limitados a ésta)



O - manosa, □ - N-acetilglucosamina, • - galactosa, ◇ - α-1-3 fucosa, Δ - ácido siálico

La complejidad de glicosilación también se evaluó mediante la determinación de la proporción molar de los diferentes monosacáridos que se encuentran en todos los glicanos (N- y O-glicanos si resulta pertinente) de la hIL-7 derivada de CHO purificada.

- 5 Todos los glicanos de las muestras de hIL-7 glicosilada purificada se trataron químicamente mediante una reacción de metanolisis para hidrolizar todos los enlaces glicosídicos entre los azúcares. Los monosacáridos liberados se separaron de la estructura peptídica y se clasificaron utilizando un aparato automático de cromatografía de gases-espectrometría de masas acoplados (Finnigan). Se determinó la proporción molar en referencia a un patrón interno conocido y a un contenido en 3 manosas de un N-glicano de mamífero clásico.
- 10 Este análisis produjo las siguientes proporciones molares para hIL-7 derivada de CHO.

Tabla 5

Monosacárido	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
Masa molecular	164	180	180	221	221	309
Superficie de picos	43382	179120	310124	33650	344476	423587
nº de nanomoles	5,41	24,76	22,15	5,26	27,29	20,94
Proporción molar	0,73	3,35	3	0,71	3,69	2,83

- 15 Se ensayó la heterogeneidad del patrón de N-glicanos específicos de sitio de la hIL-7 derivada de CHO mediante una digestión con endoproteasas, seguido de análisis de fraccionamiento y espectrometría de masas de los péptidos generados.

- 20 Las muestras purificadas se digirieron con tripsina u otras endoproteasas para generar glicopéptidos correspondientes a cada sitio de N-glicosilación de la IL-7 expresada. Cada glicopéptido se identificó mediante microsecuenciación N-terminal y mediante su tiempo de retención específico cuando se analiza mediante HPLC en fase inversa. Por tanto, cada glicopéptido se purificó de los otros. La heterogeneidad de los N-glicanos que porta el glicopéptido se analizó mediante MALDI-TOF MS (Q Star, Applied Biosystems). Los valores de m/z correspondientes a cada pico del espectro de MS permiten la identificación del patrón de N-glicanos en un sitio determinado de la hIL-7.

La O-glicosilación se ensayó mediante el uso de lectinas específicas de O-glicanos (transferencia de lectinas, véase la figura 11).

Las muestras de hIL-7 derivada de CHO purificada se separaron mediante un análisis de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las proteínas inmovilizadas se sondaron con PNA (aglutinina de cacahuete) y/o MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*) marcadas con peroxidasa (pero no se limitan a éstas), y se tiñeron para la visualización.

También se determinó la composición y heterogeneidad de los glicanos mediante el uso de la afinidad por lectinas de la hIL-7 derivada de CHO purificada.

Se seleccionó un grupo de lectinas que tienen afinidad por estructuras de N- y O-glicanos, y se emplearon para revestir microplacas de 96 pocillos. Se incubaron cantidades idénticas de preparaciones de IL-7 purificada recombinante en los pocillos de la microplaca revestidos con lectinas. Durante esta etapa, según la afinidad de una lectina concreta por la decoración de glicanos de la IL-7, diferentes cantidades de IL-7 se mantuvieron unidas a la lectina. El revelado se realizó mediante una incubación con un anticuerpo específico de IL-7 acoplado a biotina. El sándwich de lectina-IL-7-Ab fue revelado con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa.

Se utilizaron ocho lectinas diferentes para caracterizar las muestras de IL-7 purificada. Cada lectina reconoce específicamente ciertos restos de azúcares. En la tabla 6 se presenta la especificidad de estructura y de motivos de glicanos.

Tabla 6: Resumen del patrón de restos de azúcares reconocidos por las lectinas e inventario de su especificidad de estructura y de motivos de glicanos

Nombre	Glc	GlcNAc	Man	Fuc	NeuAc	GalNAc	Gal	Especificidad de la estructura de glicanos
LEA		+						oligómeros de GlcNAc β 4GlcNAc y N-acetil-lactosamina
WGA		+			+			GlcNAc, núcleo de glicanos N-enlazados, Neu5ac
UEA.I				+				fucosa
MAA					+			Neu5Ac α -3Galb4GlcNAc-
ACA						+		Galb3GalNAc α -O-R (antígeno T)
AIA							+	Gala6 o Galb3GalNAc (antígeno T), lactosa
ABA							+	Gal-GalNAc α -O-R, glicanos O-enlazados
PHA.L								Galb4GlcNAc β 6Man, N-glicanos complejos ramificados

LEA es la lectina de *Lycopersicon esculentum*; WGA de *Triticum vulgare*; UEA.I de *Ulex europeus*; MAA de *Maackia amurensis*; ACA de *Amaranthus caudatus*; AIA de *Artocarpus intergrifolia*; ABA de *Agaricus bisporus*; PHA.L de *Phaseolus vulgaris*

Los resultados se presentan en la figura 12. Las lectinas demuestran claramente una afinidad diferencial, proporcionando información acerca de la estructura general de la decoración de glicanos accesible de la proteína de IL-7 purificada en disolución. Así, ACA, ABA y AIA tienen afinidad por Gal y GalNAc. Estas tres lectinas responden de modo positivo, lo cual sugiere la presencia de estructuras de N- y O-glicanos que portan estos monosacáridos. La señal específica obtenida con ABA revela la presencia de estructuras de O-glicanos. ACA tiene una señal débil comparada con AIA y, a un grado menor, ABA. Esto indica que los O-glicanos están extendidos con pocos GalNAc como restos terminales. LEA tiene afinidad por GalNAc, lo cual indica la presencia de estructuras de N-glicanos. Entre las lectinas específicas de GlcNAc ensayadas (los datos no se muestran), sólo las que tienen afinidad por N-acetil-lactosamina muestran una señal positiva. WGA presenta una señal débil debido a una baja afinidad de unión a las estructuras nucleares de los glicanos N-enlazados. Los N-glicanos muy complejos ocultan la estructura nuclear y esto hace que sea difícil que actúe la afinidad por las lectinas. UEA.I presenta actividad específica en presencia de fucosa ramificada. La unión es bastante débil, lo cual indica una fucosilación incompleta pero eficaz de los N-glicanos. MAA tiene afinidad por los ácidos siálicos terminales. La señal de MAA es fuerte, lo cual indica una sialilación eficaz en ambos N- y O-glicanos. PHA.L tiene afinidad por las estructuras ramificadas complejas de N-glicanos y muestra una señal fuerte, corroborando los resultados de MAA. La señal de PHA.L sugiere la presencia de grandes N-glicanos tri- o tetraantenarios.

Los O-glicanos de mamífero más típicos se caracterizaron en hIL-7 derivada de CHO (cuando resulta pertinente):



En conjunto, estos análisis indican que el sistema de expresión basado en células CHO utilizado genera oligosacáridos N-enlazados complejos (triantenarios) de IL-7 humana, según se muestra en la siguiente figura, ramificados en sus restos Asn en la posición 70, 91 y 116 con una alta sialilación parcial a completa, de hasta 10 restos ácido siálico. Además, la IL-7 derivada de CHO contiene un O-glicano en la posición T110.

Por tanto, aunque porta O-glicanos y N-glicanos sialilados complejos, el lote de IL-7 purificada sigue conteniendo una mezcla de proteínas total y parcialmente glicosiladas.

Ejemplo F: De una sustancia farmacológica a un producto farmacológico: formulación, conservación y estabilidad a largo plazo de la hIL-7 expresada en células CHO recombinante

Se realizó una búsqueda de la fórmula óptima de la sustancia farmacológica a través de un estudio con una matriz combinatoria para evaluar el impacto de diversas condiciones de estrés (temperatura, tampón, pH, concentración del modificador de la tonicidad, agitación, iluminación intensa) sobre la estabilidad a largo plazo de la proteína purificada.

Se demostró que la IL-7 humana recombinante purificada muy compleja era estable en los tampones acetato y succinato a una concentración que varía de 5 a 50 mM. Los pH adecuados se eligieron de pH = 5,0 a 7,0, y las temperaturas de conservación ideales fueron entre -20 °C a +4 °C.

Pueden añadirse azúcares y bajas concentraciones de tensioactivos (polímeros de polisorbato) a la preparación para evitar la agregación soluble no covalente.

En estas condiciones, la IL-7 puede conservarse a +4 °C (en forma líquida) a una concentración que varía de 0,5 a 8,0 mg/ml, preferiblemente de 2,0 a 4,0 mg/ml, durante más de 12 meses. La composición farmacéutica en forma líquida tiene un perfil de estabilidad mejorado.

Ejemplo G: Análisis de la actividad proliferativa de IL-7 humana recombinante derivada de células de mamífero en un bioensayo específico

La actividad biológica de la IL-7 humana recombinante derivada de células de mamífero se evaluó en un bioensayo específico en una línea de células pre-B murina procedente de células de la médula ósea de ratones CBA/C57BL, PB-1 (banco celular alemán DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), que depende estrictamente de IL-7 para su crecimiento (Mire-Sluis *et al.*, 2000, J. Immunol. Methods, 236:71-76). Estas células se mantuvieron en cultivo en medio comercial que contenía IL-7 y se dejaron sin IL-7 antes de realizar el bioensayo.

Los bioensayos se realizaron con las muestras de IL-7 que se iban a ensayar, en paralelo con un control positivo de IL-7 derivada de *E. coli* conocida y un control negativo sin IL-7.

La IL-7 procedente del control o de las muestras y añadida al cultivo celular privado de IL-7 indujo el reinicio dependiente de la dosis de la proliferación celular, durante la cual las células en división incorporaron timidina radiomarcada (3H-Tdr, Amersham). Se pulsó la cantidad de radiomarcaje y se midió en cuentas por minuto (cpm) en un contador Beta de centelleo líquido (Wallack).

Como alternativa, este bioensayo puede realizarse empleando también un marcador de tinte que refleje el metabolismo general de la célula, tal como el tinte MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, reducido por la actividad redox mitocondrial) o el tinte MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio).

Unas diluciones en serie del control positivo y de las muestras que se van a ensayar permitieron la representación gráfica del número de cpm en relación con la cantidad de muestra/control ensayada.

La figura 13 presenta los datos cinéticos y las curvas de dosis-respuesta obtenidos de la forma habitual en un bioensayo típico: el crecimiento de las células PB-1 fue inducido por r-hIL-7 no glicosilada (expresada en *E. coli*) o r-hIL-7 muy glicosilada (producida en células de mamífero) (los puntos de datos representan la media $\pm$ DE de determinaciones por triplicado).

La figura 14 presenta los datos cinéticos y las curvas de dosis-respuesta obtenidos de la forma habitual en un bioensayo típico: el crecimiento de las células PB-1 fue inducido por r-hIL-7 no glicosilada (expresada en *E. coli*) o r-hIL-7 muy glicosilada o hiperglicosilada (producida en células de mamífero) (los puntos de datos representan la media $\pm$ DE de determinaciones por triplicado).

- 5 El parámetro importante a considerar para cada muestra es la ED50 = concentración (ng/ml) que produce la actividad semimáxima. Una ED50 más alta significa menos actividad.

- 10 La comparación de la actividad entre los lotes de IL-7 se aborda mediante el análisis de un parámetro de la curva de dosis-respuesta, tal como el coeficiente de pendiente, de actividad máxima. A partir de todos los parámetros de la curva, una concentración de ED50 (en ng/ml) agrupa toda la variación de los parámetros. La ED50 se corresponde con la dosis de IL-7 necesaria para inducir la mitad de la máxima actividad de inducción posible *in vitro*. A este respecto, las moléculas muy biorreactivas se corresponden con bajos valores de ED50, mientras que unas mayores concentraciones de ED50 serán típicas para preparaciones de IL-7 menos bioactivas *in vitro*.

No obstante, las diferencias de bioactividad *in vitro* no son necesariamente representativas de unas diferencias en la bioactividad *in vivo* similares en la presente invención.

15 **Ejemplo H: Evaluación *in vivo* de la inmunogenicidad del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado en primates**

La IL-7 hiperglicosilada de simio (sIL-7) expresada en una línea de células CHO (ejemplos A2, A6 y B) y purificada según el ejemplo D, se evaluó *in vivo* para la aparición de una inmunogenicidad potencial, tras administraciones repetidas de sIL-7 a primates normales.

- 20 Se incorporaron al estudio monos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) adultos jóvenes sin estimular (n = 4) y recibieron sIL-7 hiperglicosilada al nivel de dosis de 100 μ g/kg/inyección. Los animales tratados recibieron un total de 6 administraciones subcutáneas de IL-7 a lo largo de un periodo de cinco semanas consecutivas. Los animales se observaron clínicamente a lo largo de un periodo de dos meses. Se recogieron especímenes de sangre en diferentes momentos a lo largo del estudio: en el día 1 antes de la administración de sIL-7, en el día 37, y al final del estudio.

- 25 Todos los animales sobrevivieron al estudio y no presentaron reacciones adversas a la terapia de sIL-7. La administración de sIL-7 fue bien tolerada a nivel local. Cuando se ensayó la interferencia en un ensayo ELISA específico dirigido a detectar anticuerpos de unión, no se detectaron anticuerpos anti-IL-7 en el suero de ninguno de los animales ensayados. En comparación, la IL-7 recombinante derivada de *E. coli*, aunque fue producida como un producto farmacológico muy purificado, indujo, en un protocolo similar, la producción de altos títulos de anticuerpos de unión a IL-7 en el suero que varían de 1:400 a 1:5000.

30 **Ejemplo I: Actividad biológica *in vivo* del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado en primates**

La IL-7 hiperglicosilada humana (hIL-7) expresada en una línea de células CHO (ejemplos A1, A6 y B) y purificada según el ejemplo D, se evaluó *in vivo* para la determinación de los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de la hIL-7 en primates normales.

- 35 Se incorporaron al estudio monos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) adultos jóvenes sin estimular y se dividieron en dos grupos: sin tratar (n = 2), y hIL-7 100 μ g/kg/inyección (n = 2). Los animales tratados recibieron una única administración subcutánea de hIL-7. Los animales se observaron clínicamente durante 45 días. Se recogieron especímenes de sangre en diferentes momentos a lo largo del estudio: en los días 1 (0, 3, 6, 9 y 12 horas después de la inyección), 2, 3, 4, 7, 21 y 45.

- 40 La administración de hIL-7 fue bien tolerada, sin rechazo local en el sitio de la inyección. Tras la única inyección subcutánea de hIL-7 en macacos, los parámetros y el patrón farmacocinético de hIL-7 se establecieron a partir de las primeras 72 horas:

- El perfil plasmático mostró una disminución biexponencial después del pico de absorción.

- 45 - La semivida plasmática del producto observada estaba en el intervalo de 30/40 horas. Esta semivida aumenta significativamente cuando se compara con la semivida observada con la IL-7 recombinante derivada de *E. coli* (de 5 a 8 horas) administrada en las mismas condiciones. Esto refleja una mayor estabilidad *in vivo* del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado en sangre.

- El tiempo medio de residencia (MRT) fue de 40 horas frente a las aproximadamente 10 horas del producto de *E. coli*.

- 50 - El tiempo hasta alcanzar la máxima concentración fue de 180 minutos.

En conclusión, el estudio farmacocinético demostró que el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de esta invención muestra un perfil farmacocinético mejorado y prolongado, lo cual se traduce en mejores efectos farmacodinámicos.

La única inyección de hIL-7 a 100 µg/kg induce un aumento significativo en el número de células CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ periféricas, respectivamente 200% y 170% de cambios desde los valores de pretratamiento de la línea de base. El número de células de linfocitos T (CD4 y CD8) que expresan la cadena α del receptor de IL-7 específica (CD127) disminuye de forma transitoria en la sangre periférica en un momento tan temprano como a las 6 horas tras la inyección. Las células de linfocitos T que expresan CD127 reaparecen en la sangre periférica 48 horas después de la inyección y vuelven a los valores de la línea de base sólo 7 días después de la inyección. Después de una única administración subcutánea de IL-7 recombinante derivada de *E. coli*, el retorno total a los valores de la línea de base de las células de linfocitos T que expresan CD127 se produjo 4 días después de la inyección. La cinética de la ocupación de los receptores del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado es más prolongada comparada con la IL-7 recombinante derivada de *E. coli*, lo cual refleja la semivida más prolongada del polipéptido de IL-7 hiperglicosilado en primates, tal como se muestra a continuación. Estos resultados están en línea con los resultados previos que demuestran que aunque la administración intravenosa de IL-7 produce una mejor biodisponibilidad, esto no se traduce en unos mejores efectos farmacocinéticos; de hecho, el perfil de administración extendida obtenido mediante una inyección subcutánea es más eficaz que el perfil de administración aguda obtenido después de una inyección intravenosa. En este caso, la hiperglicosilación de la proteína induce un perfil cinético prolongado que, a su vez, se traduce en una mejor actividad farmacodinámica. En vista de este perfil extendido, también se espera una mejor tolerancia clínica, porque los efectos secundarios de los fármacos habitualmente están relacionados con las concentraciones pico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cytheris

<120> IL-7 glicosilada, su preparación y sus usos

<130> BO346WO

5

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.1

10

<210> 1

<211> 152

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 1

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 2
 <211> 540
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(537)
 10 <223> EPy7-hIL7-optimizada

 <400> 2

 atg ggt gtt cat gaa tgt cct gct tgg ttg tgg ttg ttg ttg tct ttg 48
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

 ttg tct ttg gtt ctg ttg cct gta gcc tct gat tgc gat att gaa ggg 96
 Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
 20 25 30

 aaa gat ggg aag cag tat gag tcc gtg ctg atg gtg agc atc gat caa 144
 Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
 35 40 45

 ttg ttg gac tcc atg aaa gaa att ggg agt aac tgc ctg aat aac gaa 192
 Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
 50 55 60

 ttt aac ttc ttt aag cgc cat atc tgt gat gct aat aag gaa ggt atg 240
 Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met
 65 70 75 80

 ttt ttg ttc cgc gct gct cgg aag ttg cgc cag ttc ctt aag atg aac 288
 Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
 85 90 95

 tct act ggt gat ttc gat ctc cac ctc ctg aaa gtt tcc gaa ggg act 336
 Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
 100 105 110

 act atc ctg ttg aac tgc act ggc cag gtt aaa gga aga aaa ccc gct 384
 Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
 115 120 125

 gcc ctg ggt gaa gcc caa cgc aca aag agt ttg gaa gaa aat aaa tct 432
 Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
 130 135 140

 ttg aag gaa cag aag aag ctg aac gac ttg tgt ttc ctg aag cgc ctg 480
 Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu
 145 150 155 160

 ttg cag gag att aag act tgt tgg aat aag atc ttg atg ggg act aag 528
 Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys
 165 170 175

 gag cat tga taa 540
 Glu His

ES 2 379 732 T3

<210> 3
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
 20 25 30

Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
 35 40 45

Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
 50 55 60

Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met
 65 70 75 80

Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
 85 90 95

Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
 100 105 110

Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
 115 120 125

Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
 130 135 140

Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu
 145 150 155 160

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

Glu His

10 <210> 4
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> *De simio*

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(537)

<223> EPy7-sIL7-optimizada

<400> 4

atg ggt gtt cat gaa tgt cct gct tgg ttg tgg ttg ttg ttg tct ttg	48
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu	
1 5 10 15	
ttg tct ttg gtt ctg ttg cct gta gcc tct gat tgc gat att gaa ggg	96
Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly	
20 25 30	
aaa gat ggg aag cag tat gag tcc gtg ctg atg gtg agc atc gat caa	144
Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln	
35 40 45	
ttg ttg gac tcc atg aaa gaa att ggg agt aac tgc ctg aat aac gaa	192
Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu	
50 55 60	
ttt aac ttc ttt aag cgc cat ctg tgt gat gat aat aag gaa ggt atg	240
Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Leu Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met	
65 70 75 80	
ttt ttg ttc cgc gct gct cgg aag ttg cgc cag ttc ctt aag atg aac	288
Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn	
85 90 95	
tct act ggt gat ttc gat ctc cac ctc ctg aaa gtt tcc gaa ggg act	336
Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr	
100 105 110	
act atc ctg ttg aac tgc act ggc aag gtt aaa gga aga aaa ccc gct	384
Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Lys Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala	
115 120 125	
gcc ctg ggt gaa ccc caa ccg aca aag agt ttg gaa gaa aat aaa tct	432
Ala Leu Gly Glu Pro Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser	
130 135 140	
ttg aag gaa cag aag aag ctg aac gac tcc tgt ttc ctg aag cgc ctg	480
Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser Cys Phe Leu Lys Arg Leu	
145 150 155 160	
ttg cag aag att aag act tgt tgg aat aag atc ttg atg ggg act aag	528
Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys	
165 170 175	
gag cat tga	537
Glu His	

5 <210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> De simio

10 <400> 5

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
20 25 30

Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln
35 40 45

Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu
50 55 60

Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Leu Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met
65 70 75 80

Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn
85 90 95

Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Lys Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala
115 120 125

Ala Leu Gly Glu Pro Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser
130 135 140

Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser Cys Phe Leu Lys Arg Leu
145 150 155 160

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

Glu His

<210> 6

<211> 480

<212> ADN

<213> Canino

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(480)

<223> EPy7-cIL-7

<400> 6

atg ggt gtt cat gaa tgt cct gct tgg ttg tgg ttg ttg tct ttg	48
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu 1 5 10 15	
ttg tct ttg gtt ctg ttg cct gta gcc tct gat tgt gat att gaa ggc Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly 20 25 30	96
aaa gac ggc aga gag tat cag cac gtt cta atg atc agc atc aat gac Lys Asp Gly Arg Glu Tyr Gln His Val Leu Met Ile Ser Ile Asn Asp 35 40 45	144
ttg gac atc atg ata aaa aat cgt acc aat tgc tcg aat aat gaa cct Leu Asp Ile Met Ile Lys Asn Arg Thr Asn Cys Ser Asn Asn Glu Pro 50 55 60	192
aac att tta aaa aaa cat gca tgt gat gat aat aag gaa ggt atg ttt Asn Ile Leu Lys Lys His Ala Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met Phe 65 70 75 80	240
tta tat cgt gct gct cac aag ttg aag caa ttt gtt aaa gtg aat aac Leu Tyr Arg Ala Ala His Lys Leu Lys Gln Phe Val Lys Val Asn Asn 85 90 95	288
agt gag gat ttc aat ctc cac tta tca aga gtt tca cag ggc aca tta Ser Glu Asp Phe Asn Leu His Leu Ser Arg Val Ser Gln Gly Thr Leu 100 105 110	336
caa ttg ttg aac tgt act ccc aag gaa gac aat aaa tct tta aag gaa Gln Leu Leu Asn Cys Thr Pro Lys Glu Asp Asn Lys Ser Leu Lys Glu 115 120 125	384
cag aga aaa cag aag agc ttg tgt tcc cta ggg ata cta cta caa aag Gln Arg Lys Gln Lys Ser Leu Cys Ser Leu Gly Ile Leu Leu Gln Lys 130 135 140	432
ata aaa act tgt tgg aac aaa att ttg agg ggc tct aaa gaa cat tga Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ser Lys Glu His 145 150 155	480

5
 <210> 7
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Canino
 <400> 7

ES 2 379 732 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly
20 25 30

Lys Asp Gly Arg Glu Tyr Gln His Val Leu Met Ile Ser Ile Asn Asp
35 40 45

Leu Asp Ile Met Ile Lys Asn Arg Thr Asn Cys Ser Asn Asn Glu Pro
50 55 60

Asn Ile Leu Lys Lys His Ala Cys Asp Asp Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Ala Ala His Lys Leu Lys Gln Phe Val Lys Val Asn Asn
85 90 95

Ser Glu Asp Phe Asn Leu His Leu Ser Arg Val Ser Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Gln Leu Leu Asn Cys Thr Pro Lys Glu Asp Asn Lys Ser Leu Lys Glu
115 120 125

Gln Arg Lys Gln Lys Ser Leu Cys Ser Leu Gly Ile Leu Leu Gln Lys
130 135 140

Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ser Lys Glu His
145 150 155

<210> 8

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> descripción de la secuencia artificial: dominio mutado

<400> 8

ctgaataacg aaactaac

18

15 <210> 9

<211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> descripción de la secuencia artificial: dominio mutado

<400> 9

aacttcacta ag 12

5 <210> 10
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> descripción de la secuencia artificial: dominio mutado
<400> 10

15 gccaacggtg cc 12

<210> 11
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> descripción de la secuencia artificial: dominio mutado
<400> 11

25 ctgaacgaca gctgt 15

<210> 12
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> descripción de la secuencia artificial: dominio mutado
<400> 12

35 atcttgaacg gg 12

<210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 13

Met	Phe	His	Val	Ser	Phe	Arg	Tyr	Ile	Phe	Gly	Leu	Pro	Pro	Leu	Ile
1				5					10					15	

Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	Ser
		20					25	

45 <210> 14
<211> 27
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 379 732 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
20 25

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
1 5 10 15

Gly

10 <210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Val
1 5 10 15

Ala Leu Ala

<210> 18

25 <211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Val Ala Leu Ala
20

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: péptido señal quimérico

10 <400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser
20 25

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polipéptido de IL-7 hiperglicosilado de mamífero purificado, en el que dicho polipéptido de IL-7 hiperglicosilado contiene al menos tres restos aminoácidos glicosilados, tiene un punto isoelectrico medio menor que 6,5 y un peso molecular medio mayor que 27 KDa, según se determina mediante una electroforesis en gel de SDS.
- 5 2.- Una composición de IL-7 hiperglicosilada, en la que dicha composición comprende al menos 80% de polipéptidos de IL-7 de mamífero que tienen al menos tres restos aminoácidos glicosilados, un punto isoelectrico medio menor que 6,5 y un peso molecular medio mayor que 27 KDa, según se determina mediante una electroforesis en gel de SDS.
- 10 3.- La composición de la reivindicación 2, en la que dicha composición comprende entre 80% y 95% polipéptidos de IL-7 de mamífero que están N-glicosilados en al menos tres restos aminoácidos diferenciados.
- 4.- La composición de la reivindicación 2 ó 3, que comprende al menos 80% de polipéptidos de IL-7 de mamífero que están glicosilados en tres a ocho restos aminoácidos diferenciados, incluyendo un sitio de O-glicosilación y hasta siete sitios de N-glicosilación.
- 15 5.- La composición de la reivindicación 4, que comprende entre 80% y 95% de polipéptidos de IL-7 de mamífero que están glicosilados en tres a ocho restos aminoácidos diferenciados, incluyendo un sitio de O-glicosilación y hasta siete sitios de N-glicosilación.
- 6.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que el polipéptido de IL-7 de mamífero es un polipéptido de IL-7 humano.
- 20 7.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que el polipéptido de IL-7 de mamífero es un polipéptido de IL-7 canino.
- 8.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los sitios de glicosilación están presentes en la naturaleza y/o se crean artificialmente en la secuencia del polipéptido de IL-7.
- 25 9.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polipéptido de IL-7 de mamífero es un polipéptido de IL-7 humano, y en el que los sitios de glicosilación se seleccionan de los restos Asn en las posiciones 70, 91 y 116; Thr en la posición 110, así como cualquier sitio de glicosilación creado artificialmente según se lista en la siguiente tabla:

Lys28Asn; Ile30Ser
Lys28Asn; Ile30Thr
Ile30Asn; Ser32Thr
Leu35Ser
Leu35Thr
Glu38Ser
Glu38Thr
Phe39Ser
Phe39Thr
Phe42Ser
Phe42Thr
Glu52Ser
Glu52Thr
Val82Asn; Glu84Ser
Val82Asn; Glu84Thr

Lys97Asn; Arg99Ser
Lys97Asn; Arg99Thr
Ala102Asn; Leu104Ser
Ala102Asn; Leu104Thr
Leu104Asn; Glu106Ser
Leu104Asn; Glu106Thr
Leu128Ser
Leu128Thr
Ile145Asn; Met147Ser
Ile145Asn; Met147Thr
Met147Asn; Thr149Ser

y preferiblemente según se lista en la siguiente tabla:

Phe39Ser
Phe39Thr
Phe42Ser
Phe42Thr
Leu104Asn; Glu106Ser
Leu104Asn; Glu106Thr
Leu128Ser
Leu128Thr
Met147Asn; Thr149Ser

o sus combinaciones.

10.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dichos polipéptidos de IL-7 comprenden o están enriquecidos en carbohidratos N-enlazados seleccionados de:

- 5
 - a) una cadena de azúcar de tipo mamífero, preferiblemente del tipo expresado por las células CHO;
 - b) una cadena de azúcar que comprende una cadena de N-carbohidrato compleja (por ejemplo, una estructura triantenaria o biantenaria), que más preferiblemente contiene un alto contenido en moléculas de manosa y acetilglucosamina y gran cantidad de restos ácido siálico terminales;
 - c) una cadena de azúcar sialilada por alfa-2,6-sialiltransferasa o alfa-2,3-sialiltransferasa; y/o
- 10
 - d) una cadena de azúcar sialilada que presenta entre 3 y 30 sialil-N-acetilgalactosamina, preferiblemente de 7 a 23.

11.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichos polipéptidos de IL-7 comprenden o están enriquecidos en una cadena o cadenas de carbohidratos O-enlazados con un resto ácido siálico terminal.

- 15
 - 12.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cadena o cadenas de carbohidratos comprenden estructuras tetraanterias a biantenarias con una sialilación terminal parcial o completa, más preferiblemente una estructura triantenaria y una tri- o bisialilación y/o una estructura diantenaria con una disialilación.

- 13.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dichos polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados muestran una semivida y un tiempo medio de residencia extendidos *in vivo* en un hospedante mamífero.
- 5 14.- La composición o el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dichos polipéptidos de IL-7 hiperglicosilados comprenden los siguientes tres puentes Cys: 1-4 (Cys2-Cys92); 2-5 (Cys34-Cys129); 3-6 (Cys47-Cys141).
- 15.- La composición o el polipéptido de la reivindicación 14, en el que dicho polipéptido de IL-7 hiperglicosilado es un polipéptido de SEQ ID NO:1.
- 10 16.- Un método para producir un polipéptido de IL-7 según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende:
- a) cultivar, en un modo de alimentación discontinua o por perfusión, una célula hospedante recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de IL-7,
- b) recoger el polipéptido de IL-7 producido a partir de dicha célula, y
- 15 c) purificar dicho polipéptido de IL-7 mediante un método que comprende al menos una etapa de una cromatografía de interacción hidrófoba, una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía de afinidad o una cromatografía de filtración en gel, por sí solas o en diversas combinaciones.
- 17.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido o una composición de IL-7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente compatibles.
- 20 18.- Un polipéptido o una composición de IL-7 hiperglicosilada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para su uso para provocar o modular una respuesta inmunológica en un sujeto.
- 19.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 18, para su uso para inducir una estimulación de la linfopoyesis prolongada y/o para amplificar una respuesta inmunológica.
- 25 20.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 18, para su uso para tratar una infección vírica, tal como una infección por VIH, hepatitis vírica, fiebre del Nilo occidental, dengue.
- 21.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 20, en el que el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra en asociación con una molécula de interferón.
- 22.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 18, para su uso para mejorar la recuperación timopoyética en un sujeto inmunocomprometido.
- 30 23.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 22, en el que el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra en asociación con un factor del crecimiento de queratinocitos, un factor de células pluripotenciales, un antagonista de gonadotropina o una hormona del crecimiento.
- 24.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 18, en el que el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra en asociación con un antígeno o una mezcla de antígenos, para proporcionar una
- 35 inmunización terapéutica contra células malignas, virus o bacterias.
- 25.- El polipéptido o la composición de IL-7 hiperglicosilada de la reivindicación 24, en el que el polipéptido de IL-7 hiperglicosilado se administra también en asociación con GM-CSF.

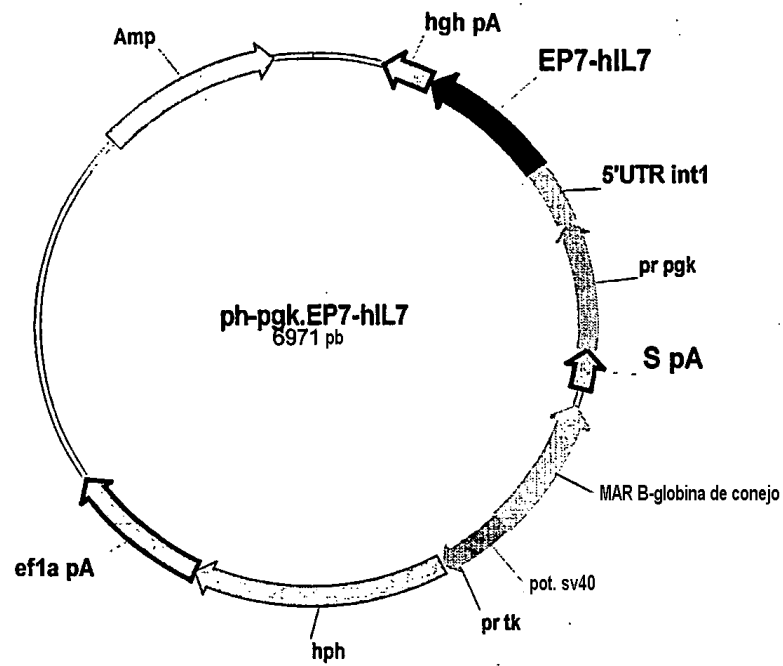


Figura 1

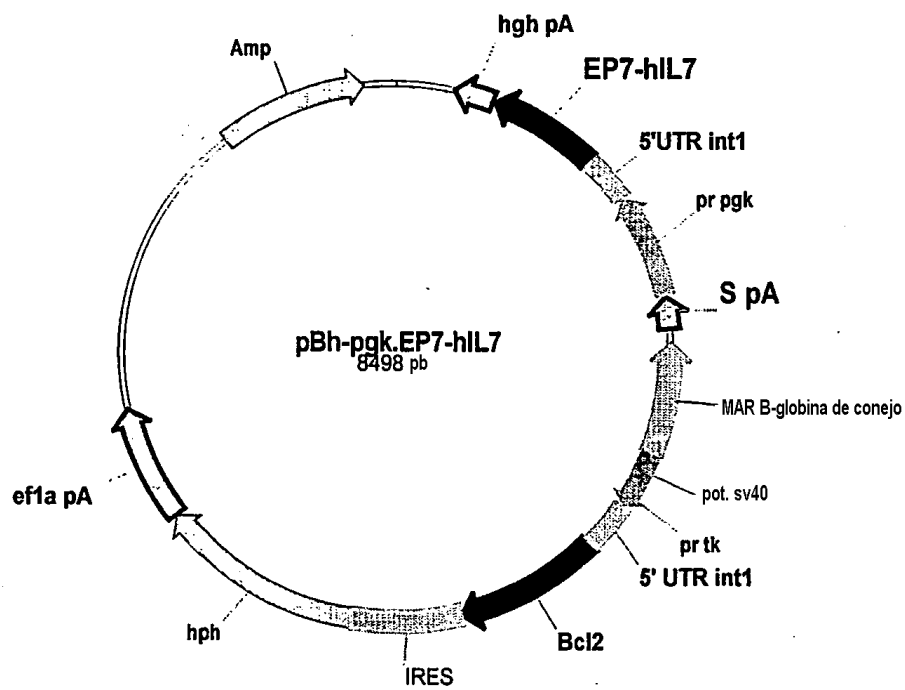


Figura 2

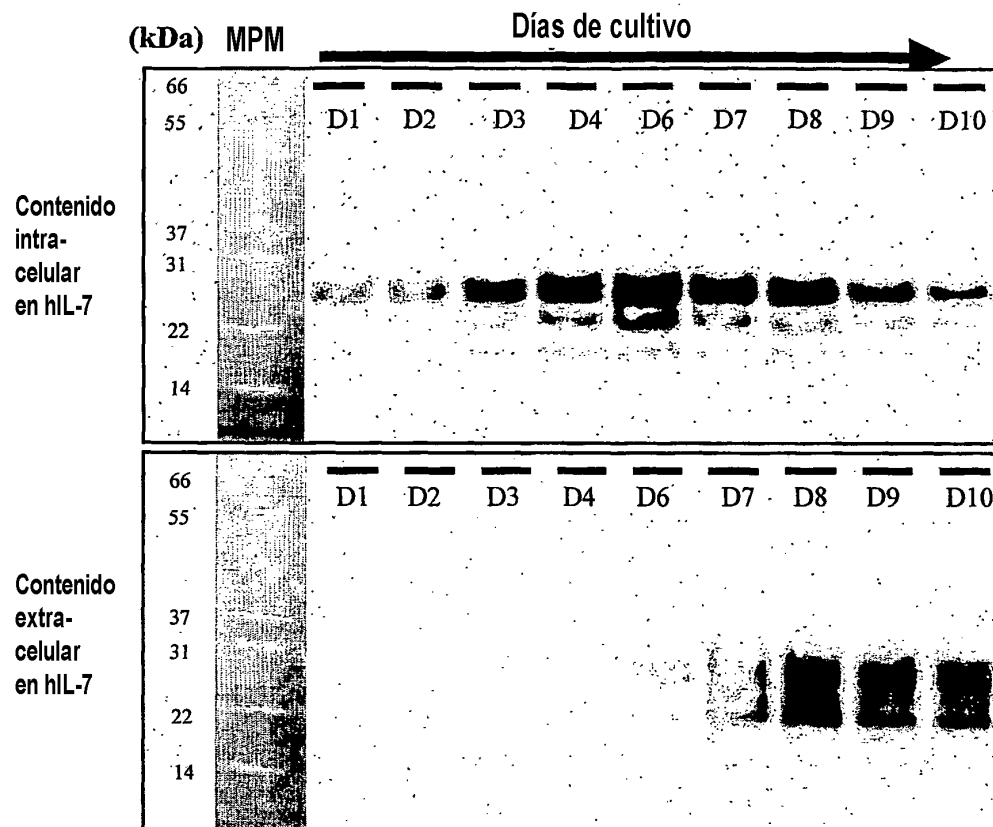


Figura 3

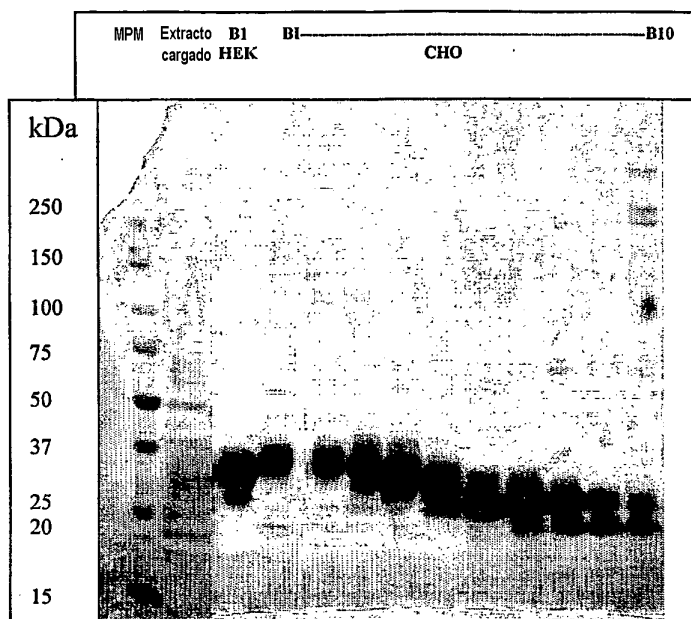


Figura 4

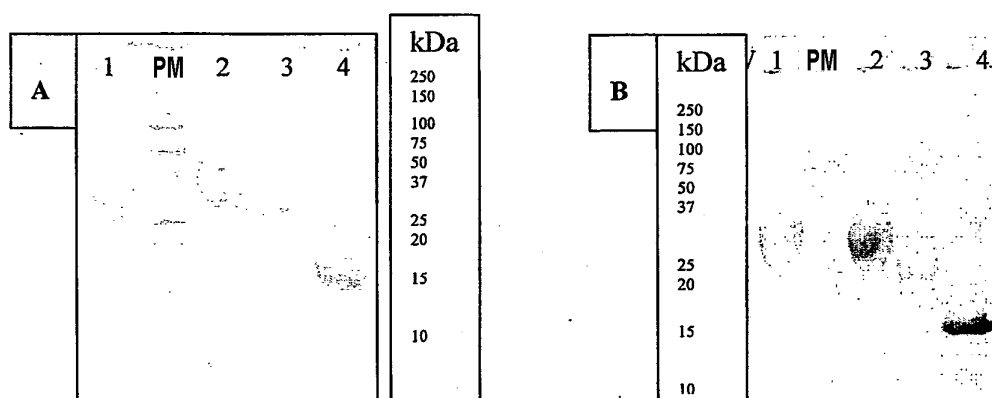


Figura 5

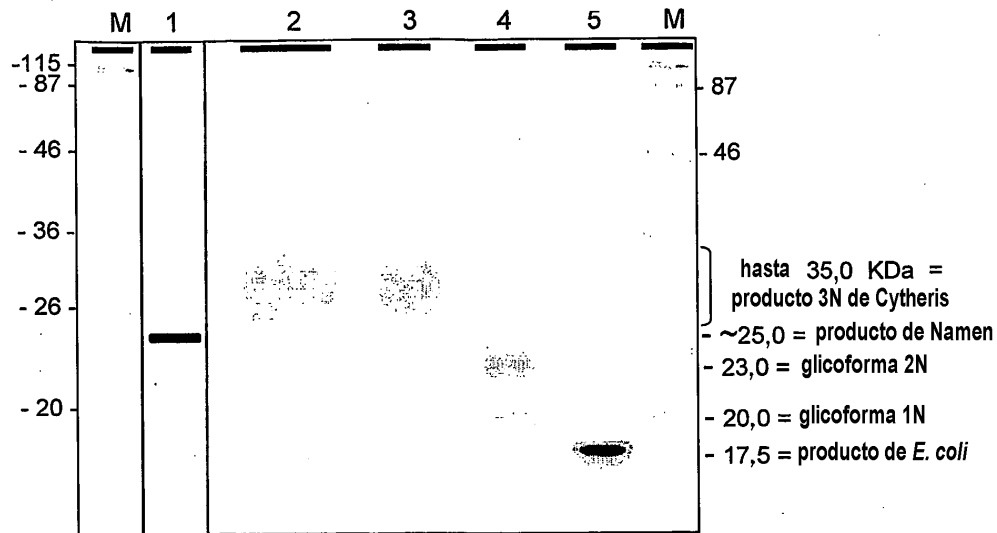


Figura 6

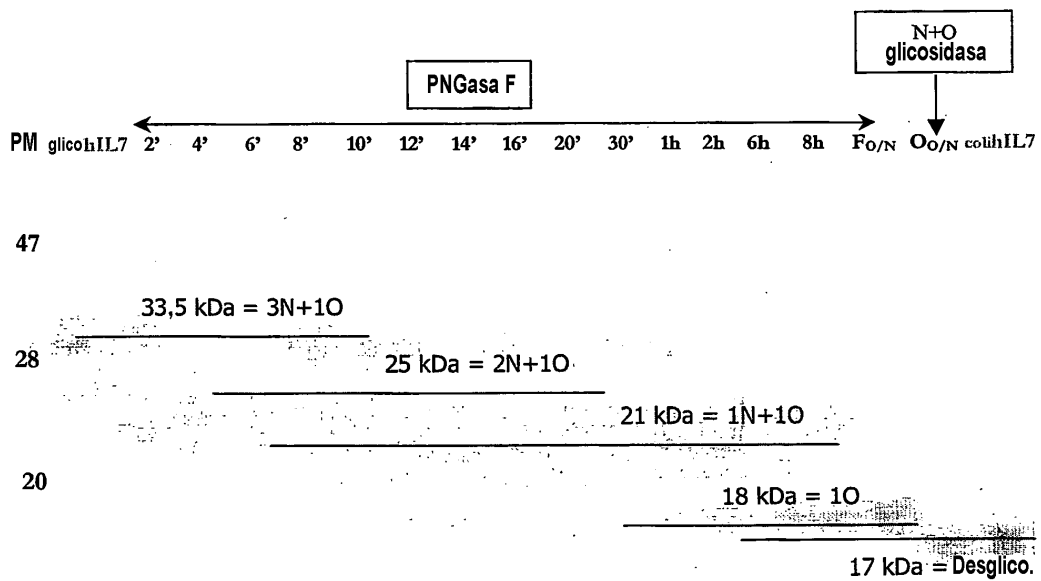


Figura 7

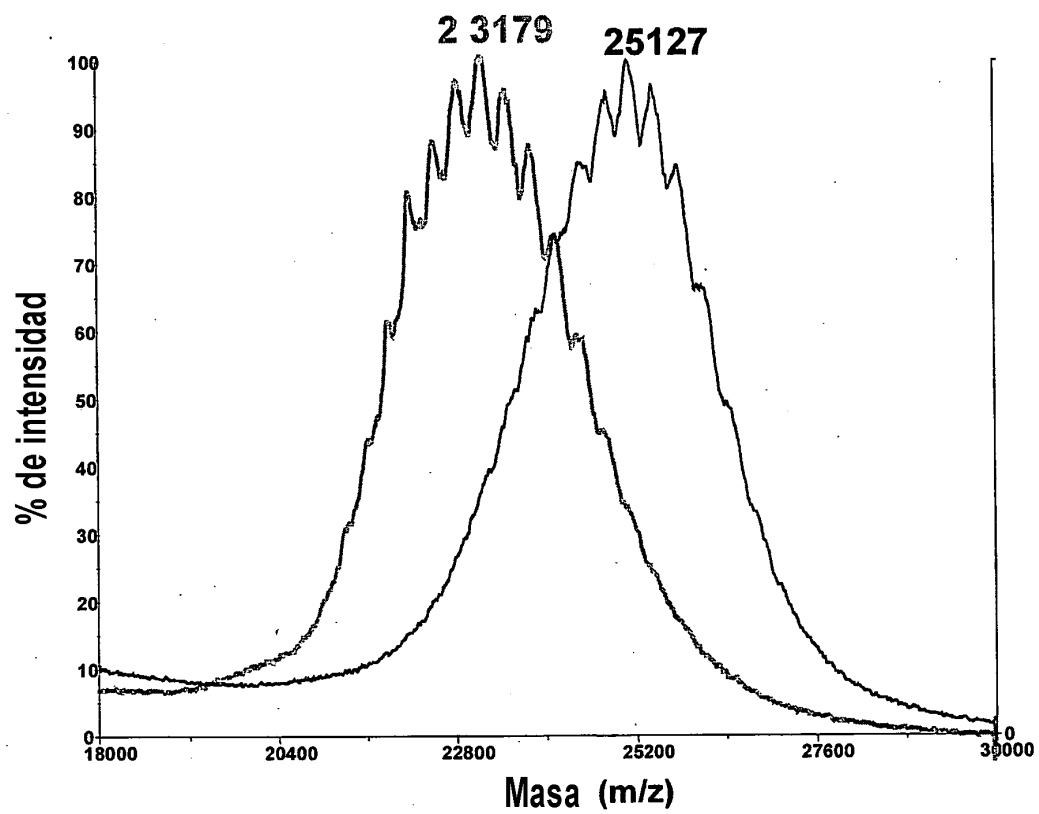


Figura 8

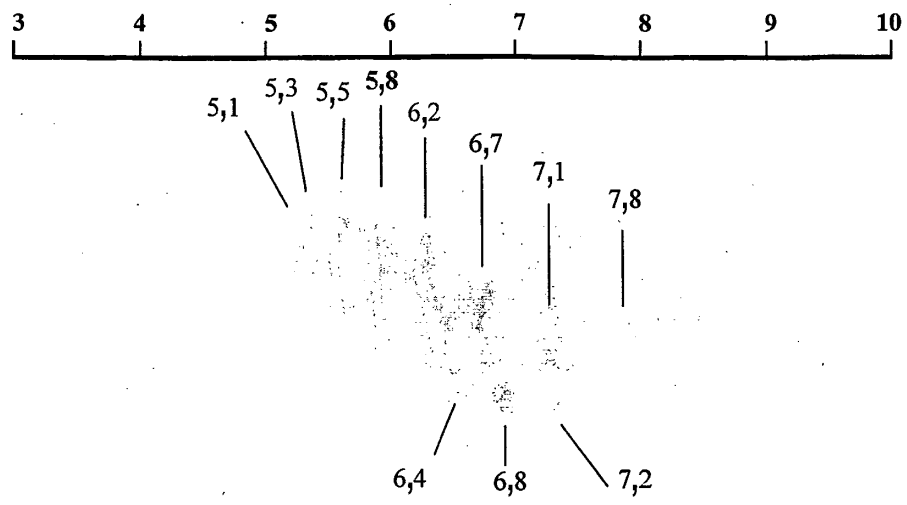


Figura 9

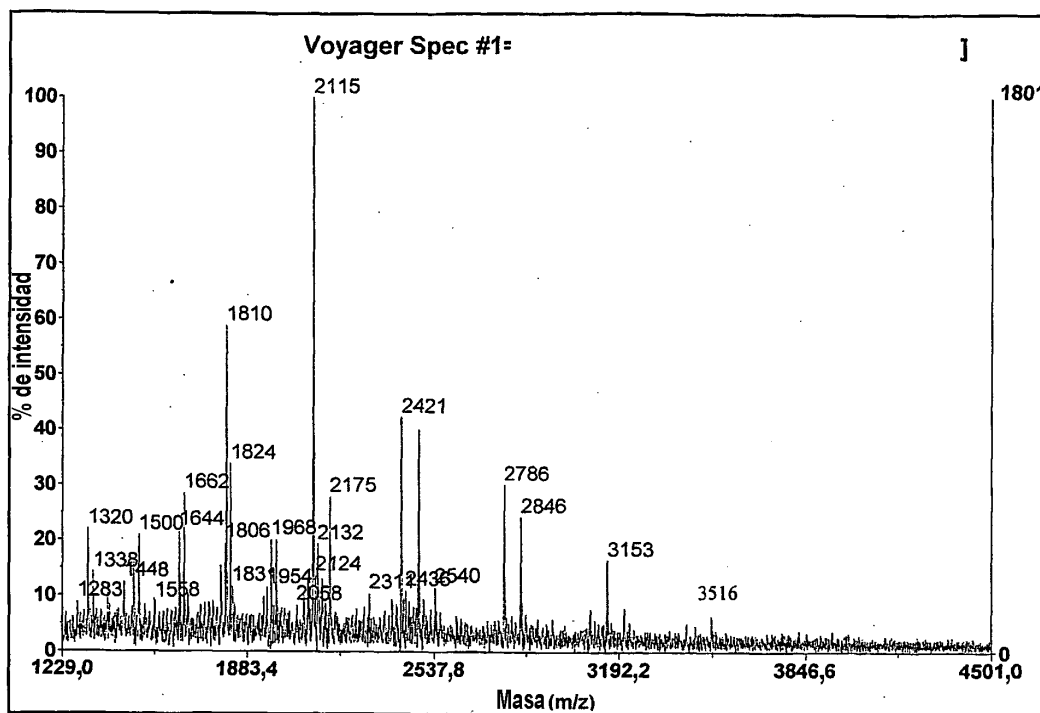


Figura 10

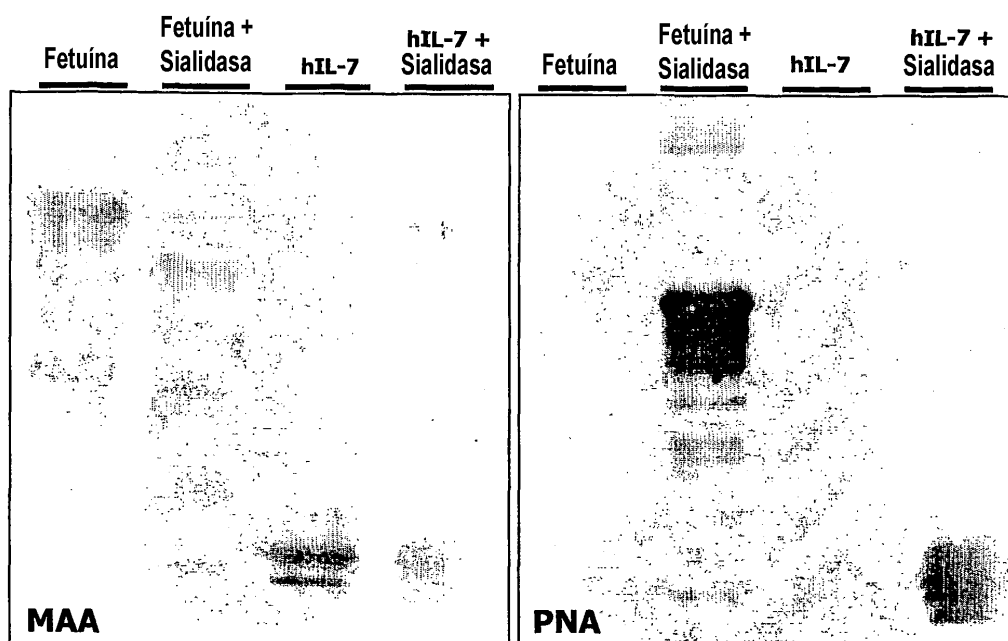


Figura 11

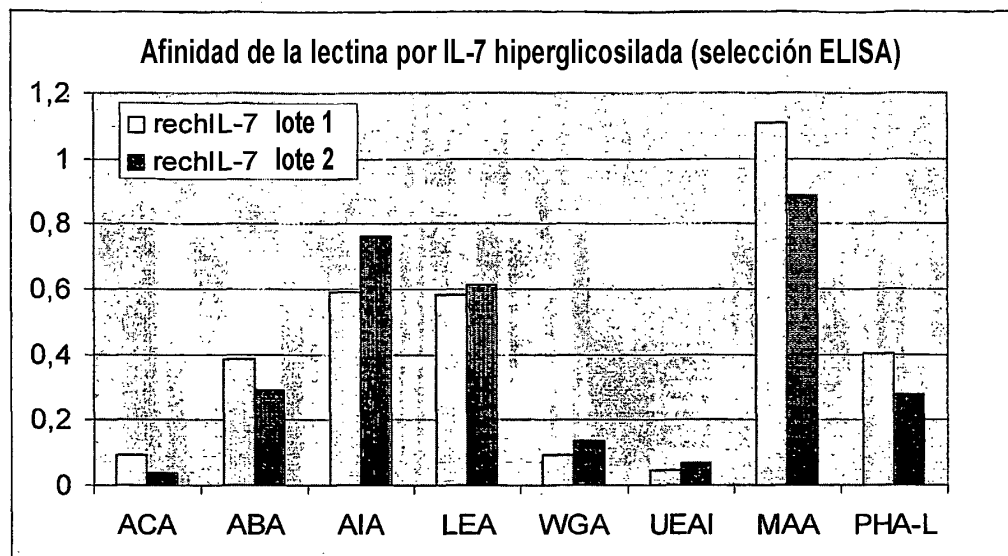


Figura 12

IL-7 E.coli y Glicosilada
ANÁLISIS DEL BIOENSAYO

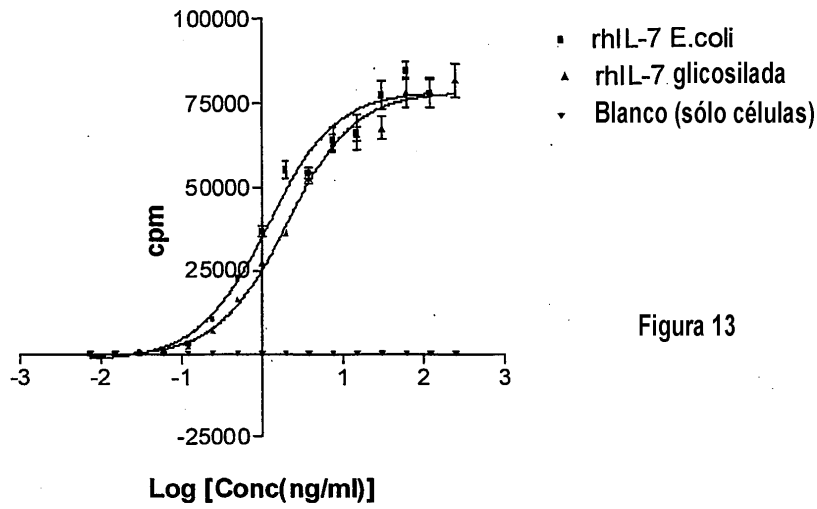


Figura 13

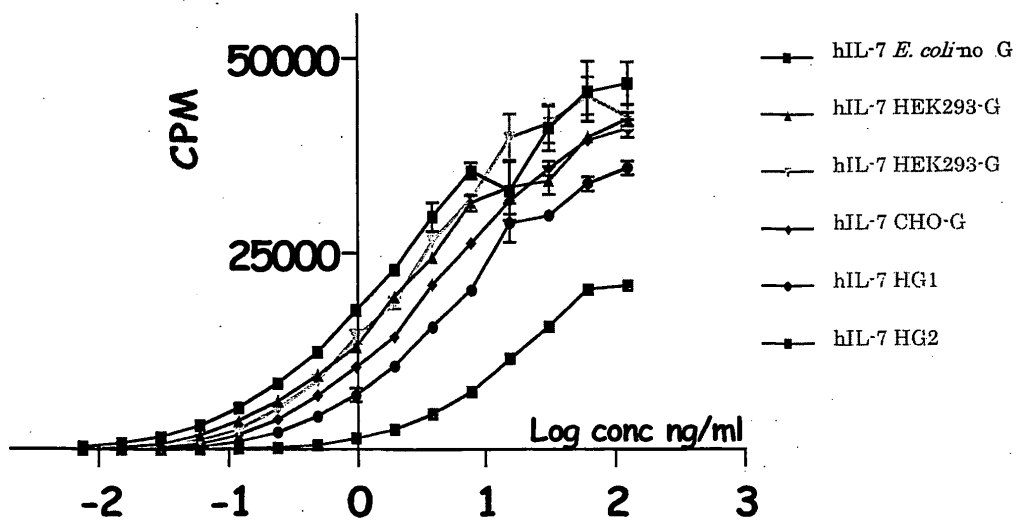


Figura 14