



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1076704 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/26 (2006.01) **C07K 14/55** (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.05.13**

(30) Prioridade(s): **1998.05.15 US 0080080**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.02.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.17**
002/2007

(73) Titular(es):

AICURIS GMBH & CO. KG

APRATHER WEG 18A 42117 WUPPERTAL DE

(72) Inventor(es):

KENNETH J. LEMBACH

US

ARMEN B. SHANAFELT

US

JEFFREY M. GREVE

US

GARY JESMOK

US

GAYLE D. WETZEL

US

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA

RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **AGONISTAS E ANTAGONISTAS SELECTIVOS DA IL-2**

(57) Resumo:

RESUMO

"AGONISTAS E ANTAGONISTAS SELECTIVOS DA IL-2"

A invenção é dirigida para um polipéptido compreendendo uma muteína IL-2 humana de acordo com a IL-2 do tipo selvagem, em que a referida IL-2 humana é substituída em, pelo menos, uma das posições 20, 88 ou 126, em que a referida muteína activa, de um modo preferido, células T em vez de células NK. D20H e I, N88G, I, e R em particular, possuem uma relativa actividade diferenciada de células T, muito maior do que a IL-2 nativa, com uma toxicidade reduzida associada *in vivo* prevista. A invenção inclui também polinucleótidos que codificam para as muteínas da invenção, vectores contendo os polinucleótidos, células hospedeiras transformadas, composições farmacêuticas compreendendo as muteínas, e métodos de tratamento terapêuticos.

DESCRIÇÃO

"AGONISTAS E ANTAGONISTAS SELECTIVOS DA IL-2"

Antecedentes

1. Campo da Invenção

A invenção refere-se, geralmente, aos campos da farmacologia e imunologia. Mais especificamente, a invenção está direccionada para novas composições de matéria para activar selectivamente células T (blastos de PHA) e possuindo activação reduzida de células "Natural Killer" ("NK"). As novas composições incluem variantes da família das citocinas e, em particular, da Interleucina-2 humana ("IL-2").

2. Descrição da Técnica Relacionada

A Interleucina 2 (IL-2) é um estimulador imunológico potente, activando diversas células do sistema imunitário, incluindo células T, células B e monócitos. A IL-2 é também um factor de crescimento potente e crítico de células T. Foi em virtude dessas actividades que a IL-2 foi testada quanto à sua capacidade para tratar o cancro. A IL-2 humana é um fármaco aprovado pela FDA para o tratamento de carcinoma renal metastático e melanoma metastático. A utilização de IL-2 em doentes elegíveis está restringida, devido à elevada toxicidade associada à terapêutica de IL-2; estima-se que, no máximo,

apenas 20% dos doentes elegíveis recebam actualmente a terapêutica. As toxicidades associadas à terapêutica de IL-2 incluem febre, náusea, vômitos, derrame vascular e hipotensão grave. Apesar destas toxicidades, todavia, a IL-2 é eficaz para as suas indicações aprovadas (~17% de taxa de resposta objectiva).

Embora a análise da estrutura/função da IL-2 de murganho tenha sido extensiva (Zurawski, S.M. e Zurawski, G. (1989) *Embo J* **8**: 2583-90; Zurawski, S.M., et al., (1990) *Embo J* **9**: 3899-905; Zurawski, G. (1991), *Trends Biotechnol* **9**: 250-7; Zurawski, S.M. e Zurawski, G. (1992) *Embo J* **11**:3905-10. Zurawski, et al., *EMBO J* **12**: 5113-5119 (1993)), ocorreu apenas análise limitada de IL-2 humana. A maior parte dos estudos com nuteínas IL-2 humanas foi realizada em células de murídeo; todavia, ocorreram estudos limitados utilizando blastos de PHA humanos que expressam o receptor da IL-2 de elevada afinidade IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Os estudos utilizando blastos de PHA confirmaram a importância dos resíduos Asp-20 e a hélice D de IL-2 humana. Foi demonstrado que a posição Asp-20 e Gln-126 da IL-2 humana são os resíduos principais responsáveis pela interacção com as subunidades β e γ do receptor de IL-2, respectivamente (revisto em Thèze, et al., *Immunol. Today*, **17**, 481-486 (1996)). Embora tenha sido demonstrado que os resíduos na hélice C de IL-2 de murganho estão envolvidos na interacção com IL-2R β de murganho (Zurawski, et al., *EMBO J*, **12**:5113-5119 (1993)), os resíduos equivalentes na IL-2 humana não demonstraram possuir as mesmas propriedades (esses resíduos na IL-2 humana seriam Asp-84 e Asn-88). Dado que é apresentada especificidade de espécie significativa entre IL-2 humana e de murganho (a IL-2 humana apresenta ~100 vezes de actividade reduzida em sistemas de murídeo), é difícil prever se o mesmo tipo de interacções ocorre dentro das fronteiras da

espécie. Não se conhecem estudos utilizando células que expressam apenas o receptor de afinidade do intermediário humano IL-2R $\beta\gamma$.

Foram examinadas algumas muteínas de IL-2 humana quanto à sua actividade em bastos de PHA humanos (Xu, et al., *Eur. Cytokine Netw*, **6**, 237-244 (1995)). Muteínas contendo substituições de Asp-20 com Leucina (D20L), assim como Arginina, Asparagina e Lisina, demonstraram possuir vários defeitos na sua capacidade para induzir a proliferação de bastos de PHA. Assim, esta técnica ensina que a substituição de Asp-20 resulta em muteínas de actividade comprometida. Adicionalmente, Xu et al referem que, até à data (1995), não foram identificadas muteínas de IL-2 úteis para aplicações clínicas ou em investigação.

A muteína Q126D de IL-2 humana criada por Buchli e Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys*, **307(2)**: 411-415, (1993) apresentou actividade significativamente comprometida tanto em potência como agonismo; em ensaios de células T humanas, apresentou uma actividade ~1000 vezes menor do que a IL-2 e comportou-se como um agonista parcial. Nos ensaios de células T de murídeo, a muteína era quase inactiva. Ambas as linhas celulares testadas expressaram a forma de actividade elevada do receptor da IL-2. Em ambos os tipos de células, Q126D apresentou a capacidade para antagonizar actividade mediada por IL-2, embora apenas parcialmente no ensaio de células T humanas.

Zhi-yong, W., et al., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **25(5)**:558-560 (Set. 1993) realizou experiências de substituição nas posições de IL-2 62, 69, 99 e 126, demonstrando uma redução de 20 vezes e 30 vezes na actividade, em comparação com IL-2 selvagem, com 62-Leu-IL-2 e 126-Asp-IL-2, respectivamente, num

ensaio de células T de murganho (CTLL-2). Todavia, não há nenhum ensinamento ou sugestão de que as substituições na posição 126 podem conferir actividade selectiva de células T sobre as células NK, ou indicação sobre se essas alterações teriam um efeito semelhante em células T humanas.

Collins, L., *et al.* *PNAS USA* **85**: 7709-7713 (1988) relataram que a substituição de Asp na posição 20 quer com Asn (D20N) ou Lys (D20K) resultou numa perda de ligação de ~100 até 1000 vezes em relação a IL-2 humana tanto para o receptor de afinidade elevada (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ denominado p55/p70 em Collins *et al.*) como intermédia (IL-2R $\beta\gamma$, denominado "p70" em Collins *et al.*). A ligação a IL-2R α pareceu não ser afectada para ambas as proteínas mutantes. Este trabalho ensina que o rebentamento da ligação ao receptor de IL-2 de afinidade intermédia (IL-2R $\beta\gamma$) também conduzirá ao rebentamento da ligação ao receptor de IL-2 de elevada afinidade (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), sugerindo que a ligação diferencial ou actuação entre IL-2R $\beta\gamma$ ou IL-2R $\alpha\beta\gamma$ não se alcança pela substituição de Asp na posição 20.

Berndt, W.G., *et al.*, *Biochemistry* **33**(21): 6571-6577 (1994) utilizaram cassete de mutagénese combinatória para mutar simultaneamente as posições 17-21 em IL-2 nativa, que se suspeita que interagem com o receptor de IL-2 de afinidade intermédia. Entre 2610 clones rastreados, apenas 42 eram activos. Eles verificaram que as posições 20 e 21 eram de principal importância para a actividade biológica. Não há sugestão ou ensinamento de substituições, excepto para L21V.

A Patente U.S. Nº 5229109 (Grimm, *et al.*) divulga alegadamente análogos de IL-2 de baixa toxicidade para utilização em imunoterapêutica e tratamento do cancro. As

propriedades de dois análogos de IL-2 com substituições nas posições Arg38 (para Alanina) e Phe42 (para Lisina) foram analisadas e comparadas com as da IL-2 nativa. Verificou-se que os análogos são capazes de manter a sua capacidade para se ligar ao receptor de IL-2 intermédio, enquanto que se ligam apenas minimamente ao chamado receptor de "elevada afinidade". Nesta altura, pensava-se que o receptor de afinidade intermédia consistia apenas em p75 (IL-2R β) e pensava-se que o receptor de afinidade elevada consistia apenas no complexo de receptores p55 + p75 (IL-2R $\alpha\beta$). Os análogos também mantiveram a sua actividade para estimular células mononucleares do sangue periférico para gerar morte activada por linfocinas (LAK). Notavelmente, a secreção de IL-1 β e TNF α foram reduzidas significativamente na resposta aos análogos, em comparação com a molécula de IL-2 nativa. Os resíduos de aminoácidos descritos nesta patente são aqueles que interactuariam especificamente com IL-2R α (p55); a eliminação de interacções com IL-2R α iria resultar em actividade reduzida em células comportando receptor de IL-2 de elevada afinidade, e não afectaria a actividade com células que comportam receptor de IL-2 de afinidade intermédia. Assim, a criação de células LAK (que se pensa derivarem de células NK) deve ser mantida. As muteínas aqui descritas são dirigidas às posições de resíduo de aminoácidos 20, 88 e 126; pensa-se que estas posições interactuam especificamente com IL-2R β (p75; posições 20 e 88), e IL-2R γ (não conhecida na altura da apresentação da patente de Grimm, *et al.*; posições 126). Como consequência, as interacções com IL-2R α permanecem inalteradas. Mecanicamente, as muteínas descritas por Grimm, *et al.* terão interacções diminuídas com o receptor de elevada afinidade de IL-2, mas não devem ter efeito no receptor de afinidade intermédia de IL-2; as muteínas aqui descritas têm as características opostas, possuindo um defeito pronunciado na sua

capacidade para interagir com o receptor de afinidade intermédia de IL-2 IL-2R $\beta\gamma$, e apresentam pouco ou nenhum defeito nas interacções funcionais com o receptor de elevada afinidade de IL-2, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

A Patente U.S. N° 5296344 (Goodson *et al.*) divulga muteínas de IL-2 em que um dos aminoácidos da sequência nativa madura de IL-2 é substituído por um resíduo de cisteína, que são então preparados e conjugados através do resíduo de cisteína substituído com um polímero seleccionado a partir de homopolímeros de polietilenoglicol ou polióis polioxietilados, em que os homopolímeros são não substituídos ou substituídos numa extremidade com um grupo alquilo. Estas muteínas são realizadas através da expressão do hospedeiro de genes mutantes codificando as muteínas que foram alteradas a partir dos genes para as proteínas parentais, através de mutagénese dirigida. Adicionalmente, podem ser conjugadas outras espécies de IL-2 através do resíduo de cisteína na posição 125 da proteína IL-2 madura que não é necessária para a actividade biológica da IL-2. Não há divulgação de mutações que conferem toxicidade reduzida.

A Patente U.S. N° 4959314 (Lin *et al.*) revela muteínas de proteínas biologicamente activas, tais como IFN- β e IL-2, nas quais, os resíduos de cisteína que não são essenciais para a actividade biológica foram removidas ou substituídas com outros aminoácidos para eliminar sítios de ligação cruzada intermolecular ou formação de ponte persulfureto intramolecular incorrecta. Estas muteínas são realizadas através de expressão bacteriana de genes mutantes que codificam as muteínas que foram sintetizadas a partir dos genes para as proteínas parentais por mutagénese dirigida por oligonucleótidos. Não há divulgação de mutações que conferem toxicidade reduzida.

A Patente U.S. N° 5116943 (Halenbeck *et al.*) divulga que uma proteína terapêutica de referência biologicamente activa é protegida contra a oxidação através de um método envolvendo substituir um aminoácido conservado para cada resíduo de metionilo, susceptível a oxidação com cloramina T ou peróxido, em que os resíduos de metionilo adicionais não susceptíveis não são tão substituídos. A muteína resistente a oxidação assim produzida é, de um modo preferido, uma muteína humana de interleucina-2 ou interferão β e o aminoácido conservado é, de um modo muito preferido, alanina. Não há divulgação de mutações que conferem toxicidade reduzida.

A Patente U.S. N° 4853332 (Mark *et al.*) é dirigida às muteínas IFN- γ e IL-2, nas quais os resíduos de cisteína que não são essenciais para a actividade biológica foram removidos ou substituídos com outros aminoácidos para eliminar sítios para ligação cruzada intermolecular ou formação de ponte persulfureto intramolecular incorrecta. A patente revela que uma substituição na IL-2 na cisteína 125 para serina resulta numa muteína com actividade comparável à IL-2 nativa.

A Pat. U.S. N° 5696234 (Zurawski *et al.*) é dirigida a muteínas de citocinas de mamífero, e métodos para rastreio para agonistas e antagonistas de citocinas de mamífero. Em particular, muteína dupla de IL-2 humana P82A/Q126D demonstrou possuir actividade antagonista em células Baf3 de murídeo co-transfectadas com as subunidades α e β de IL-2R humana. É apresentada pouca actividade agonista. Também, as muteínas de IL-2 de murídeo demonstram exibir actividade agonista e antagonista parcial e células HT2, em particular Q141D, Q141K, Q141V, e Q141L. Não são descritas actividades de muteína que

apresentem ou sugiram um efeito agonista selectivo para mutações nas posições 20, 88 e 126.

Zurawski, *et al*, descrevem muteínas de IL-2 de murídeo que possuem propriedades de serem activas em células que expressam IL-2R $\alpha\beta\gamma$, mas inactivas em células que expressam IL-2R $\beta\gamma$ (Zurawski, G., *Trends Biotechnol.* **9**: 250-257 (1991); Zurawski, S. M. e Zurawski, G. *Embo. J.* **11**: 3905-3910 (1992)). As muteínas de IL-2 de murídeo que exibem estas propriedades tinham as substituições Asp-34 para Ser ou Thr, e Gln-141 para Lys. Asp-34 e Gln-141 de IL-2 de murganho parecem equivalentes a Asp-20 e Gln-141 de IL-2 humana, respectivamente. Embora estas referências se refiram a muteínas de IL-2 "agonista selectiva", elas não descrevem o seu potencial como sendo menos tóxicas, mas mais como sendo antagonistas potenciais de IL-2 endógeno.

O documento EP 0267795 A2 (Zurawski *et al.*) divulga uma variedade de muteínas de IL-2 de murganho ao longo da sequência, incluindo algumas contendo deleções e/ou substituições nos primeiros trinta resíduos de aminoácidos N-terminais, que são biologicamente competentes, mas não inclui, discute ou sugere as substituições de aminoácidos aqui divulgadas nos resíduos equivalentes de IL-2 de murganho. Existe uma necessidade para uma molécula de IL-2 melhorada que possui toxicidade reduzida e é, de um modo geral, mais tolerada.

Taniguchi *et al.*, documento U.S. 4738927 é dirigido a um ADN recombinante que compreende um ADN recombinante codificando um polipéptido que possui uma actividade biológica de IL-2, em que a referida actividade é a promoção do crescimento de uma linha de células de linfócitos T citotóxicos, e um ADN vector capaz de se propagar numa célula procariótica ou eucariótica, estando a

sequência codificante do referido gene localizada numa posição a jusante de uma sequência de promotor, em que o referido polipéptido possui 132 a 134 aminoácidos no total na sequência de aminoácidos do polipéptido. Também descreve um gene, vectores de ADN recombinante, células hospedeiras, e métodos de produzir, de forma recombinante, IL-2 nativa. Taniguchi *et al.* não descrevem quaisquer variantes ou muteínas, e não ensinam que posições na proteína são responsáveis pela actividade de sinalização ou ligação.

Eckenberg, R. *et al* descrevem a Análise de interacções da cadeia beta do receptor de IL-2/IL-2 humana: anticorpo monoclonal H2-8 e novos mutantes IL-2 definem o papel crítico de hélice alfa A de IL-2, *Citocina*, vol, 9, nº 7, Julho de 1997 (1997-07), páginas 488-498;

O documento WO 9604306A (Schering Corporation (US); Zurawski S.M.; Zurawski G.) refere-se a Muteínas de Citocinas de Mamíferos;

JU G *et al.*: descreve a análise estrutura-função da interleucina-2 humana *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, nº 12, 25 de Abril de 1987 (1987-04-25), páginas 5723-5731 e

Ernst J.F. *et al.* está relacionado com o rastreio de muteínas secretadas por leveduras: mutagénese aleatória de Interleucina-2 humana *Bio/Technology*, vol 7, nº 7, 1 de Julho de 1989 (1989-07-01), páginas 716-720.

É claro que as muteínas de IL-2 que não apresentam a toxicidade limitante da dose das muteínas de IL-2 recombinantes

da técnica anterior são necessárias para tirar vantagem terapêutica do potencial desta citocina.

Sumário da Invenção

A invenção é dirigida a um polipéptido compreendendo uma muteína de IL-2 humana numerada de acordo com IL-2 de tipo selvagem, em a referida IL-2 humana é substituída em pelo menos uma das posições 20, 88 ou 126, pelo que a referida muteína activa, de um modo preferido, células T em relação às células NK. Esta invenção proporciona uma muteína de IL-2 menos tóxica que permite maior utilização terapêutica desta interleucina.

Além disso, a invenção é dirigida a muteínas de IL-2 possuindo mutações únicas nas posições Aspartato 20, Asparagina 88 e Glutamina 126. São representadas muteínas específicas pelos designadores D20X, N88X, e Q126X, em que "X" é um aminoácido específico que, quando substituído na IL-2 humana, confere actividade selectiva para células que expressam o receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (e. g., células T) de um modo preferido a células expressando o receptor IL-2R $\beta\gamma$ (e. g., células NK). As muteínas que exibem selectividade superior a 1000 vezes incluem D20H, D20I, N88G, N88I, N88R, e Q126L. Em particular, estas muteínas também exibem essencialmente actividade de IL-2 de tipo selvagem em células T. Também são identificadas outras mutações que proporcionam selectividade inferior a 1000 vezes mas superior a 10 vezes. A invenção também inclui polinucleótidos codificando para as muteínas da invenção, vectores contendo os polinucleótidos, células hospedeiras transformadas, composições farmacêuticas compreendendo as muteínas, e métodos terapêuticos de tratamento utilizando as muteínas.

A invenção é também dirigida a um método para seleccionar muteínas de IL-2 através da avaliação em ensaios utilizando IL-2R $\alpha\beta\gamma$, em comparação com IL-2R $\beta\gamma$, em que a actividade de uma muteína de IL-2 é aumentada em relação a IL-2 de tipo selvagem num ensaio, de um modo preferido, em relação ao outro. IL-2R $\alpha\beta\gamma$ e IL-2R $\beta\gamma$ são os ectodomínios de subunidade de receptor individual numa combinação apropriada, e são utilizados para medir directamente a ligação de muteínas de IL-2 para cada complexo de receptor. O ensaio de IL-2R $\alpha\beta\gamma$ utiliza uma resposta de um tipo de célula comportando IL-2R $\alpha\beta\gamma$, e o ensaio de IL-2 $\beta\gamma$ utiliza uma resposta de um tipo de célula comportando IL-2 $\beta\gamma$. A célula comportando IL-2R $\alpha\beta\gamma$ é um blasto de PHA, e a célula comportando IL-2 $\beta\gamma$ é uma célula NK. O ensaio é a proliferação para ambos o tipo de célula comportando IL-2R $\alpha\beta\gamma$ e tipo de célula comportando IL-2 $\beta\gamma$.

A invenção é também dirigida a um vector compreendendo o polinucleótido codificando uma muteína desta invenção, dirigindo o vector a expressão de uma muteína de IL-2 humana possuindo actividade de activação de células de blastos de PHA mas possuindo actividade reduzida de activação de células NK, sendo o vector capaz de permitir a transfecção de um organismo alvo e subsequente expressão *in vivo* da referida muteína de IL-2 humana codificada pelo referido polinucleótido.

A presente aplicação também descreve um método para tratar um doente afligido com um estado tratável de IL-2 através da administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma muteína de IL-2 humana numerada de acordo com IL-2 de tipo selvagem possuindo actividade de activação de blastos de PHA, mas possuindo actividade de activação reduzida de células NK.

Este método é aplicável quando o estado de IL-2 tratável é HIV, Cancro, doença autoimune, doença infecciosa, adjuvante de vacina em vacina de Cancro e terapêutica de vacina convencional, para estimulação imunitária em idosos ou pessoas de outra forma imunocomprometidas, assim como em doentes de SCID humanos, ou outra aplicação terapêutica requerendo estimulação do sistema imunitário.

Breve Descrição dos Desenhos

As Figuras 1 a 7 apresentam as curvas de dose-resposta curvas de IL-2 humana de tipo selvagem (IL-2) e D20H (Fig. 1), IL-2 e D20I (Fig. 2), IL-2 e N88G (Fig. 3), IL-2 e N881 (Fig. 4), IL-2 e N88R (Fig. 5), IL-2 e Q126E, (Fig. 6), e IL-2 e Q126L (Fig. 7). **A:** Resposta a dose individual de IL-2 (círculos escuros) e muteína (círculos brancos) no ensaio de proliferação de células T humanas primárias (blastos de PHA). **B:** Resposta a dose individual de IL-2 (triângulos escuros) e muteína (triângulos brancos) no ensaio de proliferação de células T humanas primárias.

Figuras 8A-8D. A toxicidade de PROLEUKIN™ em chimpanzés foi avaliada em dois animais (X-159, triângulos, e X-124, quadrados), em comparação com o controlo de veículo (X-126, losangos). A toxicidade foi avaliada por parâmetros renais (Azoto de Ureia no Sangue (BUN), A; Creatinina, B) e função hepática (Bilirrubina total, C; ALT, D).

Figura 9. Gráfico da alteração da percentagem de peso corporal ao longo de 30 dias. O peso corporal para animais

tratados com IL-2/N88R (triângulos), PROLEUKIN (quadrados) ou veículo (losangos) foi medido nos dias indicados.

Figuras 10A-10D. Linfócitos (A), glóbulos brancos totais (B), neutrófilos (C), e plaquetas (D) para animais tratados com IL-2/N88R (triângulos), PROLEUKIN (quadrados) ou veículo (losangos) foram avaliados nos dias indicados.

Figuras 11A-11D. Azoto de ureia no sangue (A, BUN), creatinina (B), fósforo (C), e intervalo aniônico (D) para animais tratados com IL-2/N88R (triângulos), PROLEUKIN (quadrados) ou veículo (losangos) foram avaliados nos dias indicados.

Figuras 12A-12D. Bilirrubina total (A), ALT (B), Fibrinogénio (C), e tempo de protrombina activada (D) para animais tratados com IL-2/N88R (triângulos), PROLEUKIN (quadrados) ou veículo (losangos) foram avaliados nos dias indicados.

Figuras 13A-13D. Níveis de sódio no sangue (A), ião cloreto (B), cálcio (C), e potássio (D) para animais tratados com IL-2/N88R (triângulos), PROLEUKIN (quadrados) ou veículo (losangos) foram avaliados nos dias indicados.

Figuras 14A-14C. Níveis de albumina no sangue (A), hematócrito (B), e hemoglobina (C) para animais tratados com IL-2/N88R (triângulos), PROLEUKIN (quadrados) ou veículo (losangos) foram avaliados nos dias indicados.

Figuras 15A-15C. O efeito de IL-2/N88R (quadrados), PROLEUKIN (losangos), e veículo (triângulos) são indicados para

a população de células T totais (A, células CD3+), população de células T CD4+ (B), e a população de células T CD8+ (C).

Figuras 16A-16C. O efeito de IL-2/N88R (quadrados), PROLEUKIN (losangos), e veículo (triângulos) são indicados para a população total de células T (A, células CD3+), população de células T CD4+ (B), e a população de células T CD8+ (C).

Figura 17. Efeito de IL-2/N88R e PROLEUKIN na ativação de células T com respeito à média de fluorescência de células CD25 positivas. O efeito de IL-2/N88R (quadrados), PROLEUKIN (losangos), e veículo (triângulos) são indicados para a população de células T CD3+CD4+. Foram obtidos números insuficientes de células CD3+/CD8+ para avaliar a média da fluorescência nesta população.

Figuras 18A-18D. O efeito de IL-2/N88R (quadrados), PROLEUKIN (losangos), e veículo (triângulos) são indicados para a população de células T CD4+ (A, células CD3+/CD4+), a população de células T CD8+ (B, células CD3+/CD8+), população de células T total (C, células CD3+), e a população de células NK (D, células CD3-/CD 16+).

Figura 19. Gráfico de metástases do pulmão *versus* dose em murganhos tratados com PROLEUKIN (círculos a branco) ou IL-2/N88R (círculos a preto). As metástases do pulmão foram contadas no final do estudo.

Figura 20. Mapa plasmídico do vector de IL2N88R pBC1IL2SA.

Descrição das Formas de Realização Preferidas

A. Antecedentes

A acção de IL-2 em células T é mediada pela ligação a proteínas do receptor de IL-2. Proteínas de superfície de célula distintas em células T ligam-se a IL-2. A primeira a ser identificada é um polipéptido simples, denominado IL-2R α que é um polipéptido de 55 kD (p55) que surge após activação de células T e foi originalmente denominado antigénio Tac (para activação de T). A IL-2R α liga-se a IL-2 com um K_d de, aproximadamente, 10^{-8} M, e é também conhecido como o receptor de IL-2 de "baixa afinidade". A ligação de IL-2 a células expressando apenas IL-2R α não conduz a qualquer resposta biológica detectável.

O segundo receptor de IL-2 é um complexo de ligação composto por IL-2R β e IL-2R γ ; IL-2R γ , um polipéptido de 64 kD, é também conhecido como a cadeia γ comum (γ_c) porque é partilhada por uma variedade de receptores de citocina. A IL-2R β tem cerca de 70 a 75 kD (denominada variadamente p70 ou p75) e é um membro da família de receptor de citocina de tipo I receptor caracterizada pelo motivo de duas cisteínas/WSXWS. A IL-2R β é expressa de um modo coordenado com γ_c . A afinidade de ligação de IL-2 a IL-2R $\beta\gamma_c$ é superior à de IL-2R α , com um K_d de, aproximadamente, 10^{-9} M; é também conhecido como o receptor de IL-2 de "afinidade intermédia". A IL-2 provoca o crescimento de células que expressam IL-2R $\beta\gamma_c$ com metade da estimulação de crescimento máxima ocorrendo à mesma concentração da IL-2 que produz metade da ligação máxima (*i. e.*, 1×10^{-9} M). A IL-2R $\beta\gamma_c$ é o mesmo complexo de receptor de sinalização que se pode ligar a IL-15.

O terceiro complexo de receptor de IL-2 conhecido é o complexo IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$. As células que expressam tanto IL-2R α como IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ pode ligar-se a IL-2 de um modo muito mais firme, com um K_d de, aproximadamente, 10^{-11} M e por isso é também conhecido com o complexo de "afinidade elevada". A estimulação do crescimento dessas células ocorre a uma concentração de IL-2 igualmente baixa. Tanto a ligação a IL-2 como a estimulação do crescimento podem ser bloqueados por anticorpos contra IL-2R α , IL-2R β , ou γ_c e mais eficientemente por uma combinação de anticorpos contra múltiplas subunidades do receptor. Estas observações sugerem que IL-2R α forma um complexo com IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$, aumentando a afinidade do receptor de sinalização para IL-2, permitindo assim que um sinal seja distribuído a concentrações de IL-2 significativamente mais baixas. Crê-se que a IL-2 se liga primeiro rapidamente a IL-2R α e isso facilita a associação com IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$. As células T em repouso expressam IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ mas apenas quantidades baixas de IL-2R α ; o aumento de IL-2R α expresso à superfície pode ser estimulado por IL-2. Após a activação de células T mediada pelo receptor do antígeno, IL-2R α é expresso rapidamente, reduzindo assim a concentração de IL-2 necessária para a estimulação do crescimento. A ligação de IL-2 ao complexo IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ resulta numa transdução de sinal através de uma via de sinalização Jak/STAT.

O requerente descobriu muteínas de IL-2 humana que activam, de um modo preferido, células T (blastos de PHA; células que expressam o receptor de IL-2 de afinidade elevada, IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$), em relação a células "Natural Killer" (NK) (células que expressam o receptor de IL-2 de afinidade intermédia IL-2R $\alpha\beta\gamma$). As muteínas que substituem Asp-20 com Histidina (D20H) ou Isoleucina (D20I), Asn-88 com Arginina (N88R), Glicina (N88G), ou Isoleucina (N88I), ou Gln-126 com Leucina (Q126L), ou Glutamato (Q126E)

apresentam inesperadamente actividade total de IL-2 com blastos de PHA e pouca actividade (ou nenhuma) em células NK. Estudos anteriores de muteínas de IL-2 humanas basearam-se em sistemas celulares de análise de murídeo e quando foram utilizadas células humanas não utilizaram células expressando apenas IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (tal como células NK). Adicionalmente, esses estudos utilizando blastos de PHA humanos demonstraram que a substituição de Asp-20 (com Leu, Arg, Asp, ou Lys; Xu, *et al.*, *Eur. Cytokine Netw*, **6**, 237-244 (1995)) ou Gln-126 (com Asp; Buchli e Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys*, **307(2)**: 411-415, 1993)) resultou em muteínas de IL-2 humanas possuindo actividade gravemente comprometida. Estudos anteriores utilizando IL-2 de murídeo identificaram muteínas de IL-2 de murganho com actividades divergentes (Zurawski, *et al.*, *EMBO J*, **12**: 5113-5119 (1993)), mas nenhuma das mutações que produziram estes resultados foram sugestivas daquelas identificadas no trabalho aqui descrito. As muteínas de IL-2 humanas contendo mutações idênticas em posições sinónimas com muteínas de IL-2 de murídeo não apresentam actividades semelhantes e por isso sugerem que os exemplos de murídeo não prevêm funcionalidade em humanos. Não são conhecidos do requerente quaisquer estudos de muteínas de IL-2 humanas comparando actividades relativas em células humanas expressando o receptor de IL-2 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (e. g., blastos de PHA) em relação a expressar o receptor de IL-2 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (e. g., células NK). É esperado que a análise *in vivo* irá confirmar que as muteínas descritas terão um índice terapêutico melhorado em relação IL-2 humano de tipo selvagem, através da redução de toxicidade, proporcionando assim compostos terapeuticamente úteis para o tratamento de distúrbios que requerem estimulação do sistema imunitário.

A interleucina 2 (IL-2) está presentemente em utilização na clínica para o tratamento de cancro renal metastático. Todavia, a sua severa toxicidade tem limitado a sua utilização a apenas um subconjunto dos doentes mais saudáveis e presume-se que a toxicidade limitada pela dose, compromete a sua eficiência global. Foi proposto que a toxicidade aguda de IL-2 é mediada através da activação de células NK, enquanto que a eficácia é mediada pela activação directa de células T (Jacobson *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (Estados Unidos), 17 de Set de 1996, **93**(19)p10405-10; Smith K.A., *Blood* 1993, **81**(6)p1414-23; Kaplan *et al.*, *Biotechnology*, **10**(2)p157-62). As células T expressam um receptor diferente para IL-2 do que as células NK (células T: ILR $\alpha\beta\gamma$, o receptor de IL-2 de afinidade elevada; células NK: IL-2R $\beta\gamma$, o receptor de IL-2 de afinidade intermédia). As muteínas de IL-2 humanas aqui descritas activam o receptor de IL-2 das células T e não o receptor de IL-2 das células NK.

A terapêutica de dose baixa com IL-2 foi utilizada para evitar a activação directa as células NK com algum sucesso (Jacobson, *et al.*, (1996). *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10405-10). Esta estratégia incorporou o conceito de que a doses baixas de IL-2, apenas o receptor de IL-2 de afinidade elevada será activado para a exclusão do receptor de IL-2 de afinidade intermédia. A forma de actividade intermédia do receptor IL-2, IL-2R $\beta\gamma$, é expressa em células NK, enquanto que as células T expressam a forma de afinidade elevada, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

Todavia, o requerente abordou o problema da toxicidade de um ângulo diferente. A quebra das interacções de IL-2 com IL-2R β e/ou IL-2R γ através de modificação apropriada de resíduos de ligação específicos na superfície de ligação de IL-2 foram propostos para prevenir a ligação efectiva (e, desse modo,

activação) para células que expressam apenas IL-2R $\beta\gamma$. Todavia, em células que expressam IL-2R $\beta\gamma$, a ligação inicial a IL-2R α e desse modo a ligação à célula, ainda assim ocorrerá, e desse modo a terapêutica de dose baixa sugerida por Jacobs *et al.* pode ainda manifestar efeitos tóxicos colaterais. Em virtude da ligação de IL-R α , o recrutamento efectivo de IL-2R β e IL-2R γ pode ocorrer na superfície celular, apesar das interacções diminuídas da IL-2 modificada com IL-2R β e/ou IL-2R γ . Pode por isso ser formado um complexo de IL-2/ IL-2R $\alpha\beta\gamma$ competente para sinalização. Crê-se que uma variante de IL-2 capaz de activar selectivamente os receptores de IL-2 de afinidade elevada em células T como preferência aos receptores de IL-2 de afinidade intermédia em células NK pode ter um índice terapêutico aumentado em relação a IL-2 de tipo selvagem, devido a um perfil de toxicidade reduzida. Uma variante de IL-2 com um índice terapêutico aumentado poderia ter uma gama de utilização significativamente expandida tanto no tratamento do cancro (como uma terapêutica directa e/ou auxiliar) como de imunodeficiência (e. g., HIV e tuberculose). Outras utilizações potenciais de IL-2 são derivadas da sua actividade imunoestimuladora e inclui, para além do tratamento directo de doentes com cancro, imunodeficiência, tal como HIV e SCID humana; doença infecciosa, tal como tuberculose; como um adjuvante em estratégias de "vacina para o cancro"; e para indicações de estimulação do sistema imunitário, tal como protocolos de vacinação convencionais intensificadores ou para o tratamento dos idosos.

A substituição apropriada em Asp-20, Asn-88 ou Gln-126 reduziu as interacções da ligação, tanto para IL-2R β (Asp-20 e Asn-88) como IL-2R γ (Gln-126). O efeito líquido dessas substituições resultou em muteínas de IL-2 que retiveram

actividade em células T humanas e possuem actividade reduzida em células NK humanas.

Como não foi possível prever o resultado de uma dada substituição antes da avaliação nos ensaios de células T e NK, todas as substituições de aminoácidos naturais possíveis (excepto Cys) foram realizadas nas posições Asp-20, Asn-88 e Gln-126, e foi realizado um conjunto limitado, mas diverso, de mutações na posição Asp-84 para testar se na verdade interagem com IL-2R β . Mutações adicionais seriam testadas na posição Asp-84 se fossem observados efeitos nas interacções de IL-2R β aparentes. Os resultados para quarenta e seis substituições separadas nestas posições são apresentados na Tabela 1, *infra*.

As mutações foram introduzidas utilizando mutagénesse dirigida em ADNc de IL-2 humana de tipo selvagem. Os clones correctos foram sub-clonados num vector de expressão adequado para expressão num sistema heterólogo (e. g., *E. coli*, baculovírus, células de levedura ou mamífero, tais como, por exemplo, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO). As proteínas purificadas foram testadas em ensaios de proliferação de células T (blastos de PHA) e proliferação de NK. As respostas diferentes criadas por muteínas individuais entre estes ensaios, i. e., EC₅₀, indicam mutações que realizam estas actividades. Especificamente, as muteínas que estimulam uma resposta relativamente mais forte no ensaio de blasto de PHA (célula T) (vs. IL-2 de tipo selvagem), como comparado com a resposta em ensaio de células NK (vs. IL-2 de tipo selvagem) irá sugerir substituições que proporcionam especificidade celular com base na capacidade para muteínas específicas se ligarem a, e activarem IL-2R $\alpha\beta\gamma$ expressas nestas células, mas incapazes de se ligarem, e por isso não activarem, células expressando apenas

IL-2R $\beta\gamma$. As muteínas de IL-2 que exibem esta propriedade possuirão assim *in vivo* as propriedades imunoestimuladoras de IL-2 com toxicidades associadas a terapêutica de IL-2 reduzidas de derrame vascular e hipotensão.

B. Definições

Como aqui utilizado, "IL-2 de tipo selvagem" significa IL-2, quer nativa ou recombinante, possuindo a sequência de 133 aminoácidos que ocorrem naturalmente de IL-2 nativa humana (menos o péptido de sinal, consistindo em 20 aminoácidos N-terminais adicionais), cuja sequência de aminoácidos é descrita em Fujita, *et al.*, *PNAS USA*, **80**, 7437-7441 (1983), com ou sem uma Metionina N-terminal adicional que é, necessariamente incluída quando a proteína é expressa como uma fracção intracelular em *E. coli*.

Como aqui utilizado "muteína IL-2" significa um polipéptido em que foram realizadas substituições específicas para a proteína de interleucina-2 madura humana. A Tabela 1, *infra*, revela quarenta e seis muteínas de IL-2 de substituição individual e os seus resultados de actividade relativa correspondentes. Formas de realização preferidas incluem as muteínas possuindo, pelo menos, actividade relativa de 100 vezes. Formas de realização, de um modo particularmente preferido, incluem as seguintes que apresentam actividade relativa superior a 1000 vezes: resíduo de aspartato (Asp) (D) na posição 20 ("D20"), quando numerado de acordo com a IL-2 de tipo selvagem, é substituído com isoleucina, ("D20I") ou Histidina ("D20H"); o resíduo de asparagina (Asn) na posição 88 (N88) foi substituído com Isoleucina (N88I), Glicina (N88G) ou

Arginina (N88R); e o resíduo de glutamina (Gln) na posição 126 (Q126) foi substituída com Leucina (Q126L), ou Glutamato (Q126E) ou Aspartato (Q126D). As muteínas de IL-2 preferidas possuem uma sequência de aminoácidos idêntica à IL-2 de tipo selvagem nos outros resíduos não substituídos. Todavia, as muteínas de IL-2 desta invenção também pode ser caracterizada por inserções, deleções, substituições e modificações de aminoácidos num ou mais sítios nos, ou perto dos outros resíduos da cadeia de polipéptido de IL-2 nativa. De acordo com esta invenção, quaisquer destas inserções, deleções, substituições e modificações podem resultar numa muteína de IL-2 que retém uma actividade selectiva de blasto de PHA, embora possuindo capacidade reduzida para activar células NK e vem no âmbito desta patente.

Combinar as substituições preferidas, ou particularmente preferidas acima descritas numa única molécula de IL-2 recombinante única pode resultar na combinação de mutantes possuindo actividade semelhante aquela aqui divulgada pelos mutantes únicos. Por exemplo, pode esperar-se que uma molécula de IL-2 possuindo uma combinação de duas ou mais mutações seleccionadas a partir da Tabela 1 pode resultar num agonista de IL-2 selectivo para células T com actividade relativa semelhante à actividade relativa das substituições únicas aqui reveladas. Os mutantes de combinação estão dentro do espírito e do âmbito da presente invenção.

São preferidas modificações conservadoras e substituições noutras posições de IL-2 (*i. e.*, as que possuem um efeito mínimo na estrutura secundária ou terciária da muteína). Essas substituições conservadas incluem as descritas por Dayhoff em The Atlas of Protein Sequence and Structure **5** (1978) e por Argos

em *EMBO J.*, **8**:779-785 (1989). Por exemplo, aminoácidos pertencendo a um dos seguintes grupo representam alterações:

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe;
- lys, arg, his;
- phe, tyr, trp, his; e
- asp, glu.

São também preferidas modificações ou substituições que não introduzem sítios para ligação reticuladas intermoleculares adicionais ou formação de ligação persulfureto incorrecta. Por exemplo, a IL-2 é conhecida por possuir três resíduos de cys, nas posições de tipo selvagem 58, 105 e 125 da sequência madura.

Assim, a presente invenção refere-se a

Uma muteína de IL-2 humana numerada de acordo com IL-2 de tipo selvagem possuindo uma substituição de aminoácidos numa das posições 20, 88 e 126, em que a substituição na posição 20 não inclui arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glicina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, treonina ou triptofano; a substituição na posição 88 não inclui asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, triptofano ou prolina; a substituição na posição 126 não inclui ácido aspártico, alanina, histidina, triptofano, cisteína, glutamina, ácido glutâmico ou lisina; e em que a referida muteína de IL-2 activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

É preferida uma muteína de IL-2, em que a posição 20 é substituída por um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: alanina, histidina, isoleucina, metionina, glutamina, serina, valina e tirosina, em que a referida muteína activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

Também é preferida uma muteína de IL-2, em que a posição 88 é substituída por um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: alanina, arginina, ácido glutâmico, histidina, lisina, leucina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, serina, treonina, tirosina e valina, em que a referida muteína activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

É mais preferida uma muteína de IL-2, em que a posição 88 é substituída com arginina.

É também preferida uma muteína de IL-2, em que a posição 126 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: asparagina, leucina, prolina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, arginina, serina, treonina, tirosina e valina, em que a referida muteína activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

A invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêutico e a muteína de IL-2 humana como acima definida, em que a referida composição activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

A invenção refere-se ainda a uma muteína de IL-2 humana numerada de acordo com IL-2 de tipo selvagem, possuindo

substituições nas duas posições 20, 88 e 126, em que a referida substituição na posição 20 não inclui arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glicina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, treonina ou triptofano; a referida substituição na posição 88 não inclui asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, triptofano, ou prolina; e a referida substituição na posição 126 não inclui ácido aspártico, alanina, histidina, triptofano, cisteína, glutamina, ácido glutâmico ou lisina; e em que a referida muteína de IL-2 activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

A invenção inclui ainda um polinucleótido compreendendo uma sequência de ADN que codifica a muteína de IL-2 como definido acima, um vector compreendendo o polinucleótido e uma célula eucariota isolada transformada com o referido polinucleótido e também uma célula procariota com o referido polinucleótido.

Por "numerado de acordo com a IL-2 de tipo selvagem" entende-se identificar um aminoácido escolhido com referência à posição na qual o aminoácido normalmente ocorre na sequência madura de IL-2 de tipo selvagem. Onde são realizadas inserções ou deleções à muteína de IL-2, um especialista na técnica entenderá que a Asp que ocorre normalmente na posição 20 pode ser desviada na posição na muteína. Todavia, a localização da Asp desviada pode ser rapidamente determinada por inspecção e correlação dos aminoácidos flanqueadores com os que flanqueiam a Asp na IL-2 de tipo selvagem.

O termo "tipos de células possuindo o receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ " significa que as células conhecidas por possuir este tipo de receptor, i. e., células T, células T activadas, células B,

monócitos activados e células NK activadas. O termo "tipos de células possuindo o receptor IL-2R $\beta\gamma$ " significa as células conhecidas por possuírem esse tipo de receptor, *i. e.*, células B, monócitos em repouso e células NK em repouso.

As muteínas de IL-2 da presente invenção podem ser produzidas por qualquer método adequado conhecido na técnica. Esses métodos incluem construir uma sequência de ADN codificando as muteínas de IL-2 desta invenção e expressar essas sequências num hospedeiro transformado adequado. Este método irá produzir as muteínas recombinantes desta invenção. Todavia, as muteínas desta invenção também podem ser produzidas, embora de um modo menos preferido, por síntese química ou por uma combinação de síntese química e tecnologia do ADN recombinante. Os métodos de produção do tipo descontínuo ou de perfusão estão geralmente dentro da especialidade na técnica. Ver Freshey, R.I. (ed), "Animal Cell Culture: A Practical Approach", 2ª ed., 1992, IRL Press, Oxford, Inglaterra; Mather, J.P. "Laboratory Scaleup of Cell Cultures (0,5-50 litros)", *Methods Cell Biology* **57**:219-527 (1998); Hu, W.S., e Aunins, J.G., "Large-scale Mammalian Cell Culture", *Curr Opin Biotechnol* **8**: 148-153 (1997); Konstantinov, K.B., Tsai, Y., Moles, D., Matanguihan, R., "Control of long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat", *Biotechnol Prog* **12**: 100-109 (1996).

Numa forma de realização de um método recombinante para produzir uma muteína desta invenção, uma sequência de ADN é construída isolando ou sintetizando uma sequência de ADN codificando a IL-2 de tipo selvagem e depois alterando o codão para Asp20 num codão para Isoleucina (I) através de mutagéneses específico para um sítio. Esta técnica é bem conhecida. Ver, *e. g.*, Mark et al., "Site-specific Mutagenesis Of The Human

Fibroblast Interferon Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, pp. 5662-66 (1984); e Patente dos Estados Unidos nº 4588585, aqui incorporada por referência.

Outro método de construir uma sequência de ADN codificando as muteínas de IL-2 desta invenção seria a síntese química. Isto, por exemplo, inclui síntese directa de um péptido por meios químicos da sequência de proteína codificando para uma muteína de IL-2 exibindo as propriedades descritas na invenção. Este método pode incorporar tanto aminoácidos naturais como não naturais nas posições que afectam as interacções de IL-2 com o IL-2R β ou IL-2R γ . Alternativamente, um gene que codifica a muteína de IL-2 desejada pode ser sintetizado por meios químicos utilizando um sintetizador de oligonucleótidos. Esses oligonucleótidos são concebidos com base na sequência de aminoácido da muteína de IL-2 desejada e, de um modo preferido, seleccionar os codões que são favorecidos na célula hospedeira em que a muteína recombinante será produzida. A este respeito, será reconhecido que o código genético é degenerado - que um aminoácido pode ser codificado por um ou mais do que um codão. Por exemplo, Phe (F) é codificado por dois codões, TCC ou TTT, Tyr (Y) é codificado por TAC ou TAT e his (H) é codificado por CAC ou CAT. Trp (W) é codificado por um único codão, TGG. Consequentemente, pode ser entendido que para uma dada sequência de ADN codificando uma muteína de IL-2 particular, existirão muitas sequências degeneradas de ADN que irá codificar muteína de IL-2. Por exemplo, será entendido que, adicionalmente à sequência de ADN preferida para a muteína D20I apresentada em SEQ ID N°:1, existirão muitas sequências degeneradas de ADN que codificam para a muteína de IL-2 apresentada. Estas sequências de ADN degeneradas são consideradas dentro do âmbito desta invenção. Por isso, as "suas variantes degeneradas", no contexto

desta invenção, significa todas as sequências de ADN que codificam para, e por isso permitem a expressão, de uma muteína particular.

A sequência de ADN codificando a muteína de IL-2 desta invenção, quer preparada por mutagénese dirigida, síntese química ou outros métodos, pode também incluir, ou não, sequências de ADN que codificam uma sequência sinal. Essa sequência sinal, se presente, deve ser uma reconhecida pela célula escolhida para expressão da muteína de IL-2. Pode ser procariótica, eucariótica ou uma combinação das duas. Pode também ser uma sequência sinal de IL-2 nativa. A inclusão de uma sequência sinal depende de ser ou não desejável secretar a muteína de IL-2 das células recombinantes nas quais é produzida. Se as células escolhidas são procarióticas, geralmente, é preferido que a sequência de ADN não codifique uma sequência sinal. Se as células escolhidas são eucarióticas, geralmente, é preferido que uma sequência sinal seja codificada e, de um modo mais preferido, que seja utilizada a sequência sinal de IL-2 de tipo selvagem.

Podem ser aplicados métodos convencionais para sintetizar um gene codificando uma muteína de IL-2 de acordo com esta invenção. Por exemplo, a sequência de aminoácidos completa pode ser utilizada para construir um gene retro-traduzido. Pode ser sintetizado um oligómero de ADN contendo uma sequência de nucleótidos codificando para muteína de IL-2. Por exemplo, podem ser sintetizados e depois ligados vários pequenos oligonucleótidos codificando para porções do polipéptido desejado. Os oligonucleótidos individuais contêm tipicamente extremidades coesivas 5' ou 3' para montagem complementar.

Uma vez montadas (por síntese, mutagénese dirigida ou outro método), as sequências de ADN codificando uma muteína de IL-2 desta invenção serão inseridas num vector de expressão e ligadas operacionalmente a uma sequência de controlo de expressão apropriada para expressão da muteína de IL-2 no hospedeiro transformado desejado. A montagem apropriada pode ser confirmada por sequenciação de nucleótidos, mapeamento de restrição e expressão de um polipéptido biologicamente activo num hospedeiro adequado. Como é bem conhecido na técnica, de modo a obter níveis de expressão elevados de um gene transfectado num hospedeiro, o gene deve ser ligado operacionalmente a sequências de controlo de transcrição e de tradução da expressão que são funcionais no hospedeiro de expressão escolhido.

A escolha da sequência de controlo de expressão e do vector de expressão dependerá da escolha do hospedeiro. Podem ser empregues uma vasta variedade de combinações de hospedeiro/vector. Vectores de expressão úteis para hospedeiros eucarióticos incluem, por exemplo, vectores compreendendo sequências de controlo de expressão de SV40, vírus papiloma bovino, adenovírus e citomegalovírus. Vectores de expressão úteis para hospedeiros bacterianos incluem plasmídeos bacterianos conhecidos, tais como plasmídeos de *E. coli*, incluindo col EI, pCR1, pER32z, pMB9 e seus derivados, plasmídeos de um leque de hospedeiros mais vasto, tais como RP4, ADNs de fago, e. g., os numerosos derivados do fago lambda, e. g., NM989 e outros fagos de ADN, tais como M13 e fagos de ADN de cadeia simples filamentosos. Vectores de expressão úteis para células de leveduras incluem o plasmídeo 2 μ e seus derivados. Vectores úteis para células de insecto incluem pVL 941. É preferido pFastBacTM 1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). Cate et al., "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian

Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells", *Cell*, **45**, pp. 685-98 (1986).

Adicionalmente, qualquer uma de uma variedade de sequências de controlo pode ser utilizada nestes vectores. Essas sequências de controlo úteis incluem as sequências de controlo de expressão associadas a genes estruturais dos vectores de expressão antecedentes. Exemplos de sequências de controlo de expressão úteis incluem, por exemplo, os promotores precoces e tardios de SV40 ou adenovírus, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC ou TRC, as regiões do operador principal e do promotor de fago lambda, por exemplo, PL, as regiões de controlo da proteína da capa de fd, o promotor para a cinase de 3-fosfoglicerato ou outras enzimas glicolíticas, os promotores da fosfatase ácida, e. g., PhoA, os promotores do sistema de combinação α das leveduras, o promotor poliédrico de Baculovírus e outras sequências conhecidas para controlar a expressão de genes de células procariotas ou eucariotas ou seus vírus e várias combinações destes.

Qualquer hospedeiro adequado pode ser utilizado para produzir as muteínas de IL-2 desta invenção, incluindo bactérias, fungos (incluindo leveduras), células ou linhas de células vegetais, de insectos, mamífero ou outras apropriadas, bem como animais transgénicos não humanos ou plantas. Mais particularmente, estes hospedeiros podem incluir hospedeiros eucariotas e procariotas bem conhecidos, tais como estirpes de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungos, leveduras, células de insectos, tais como *Spodoptera frugiperda* (Sf9), células animais, tais como células de ovário de hamster chinês (CHO) e de murganho, tais como células de NS/O, macaco verde Africano, tais como COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 e BNT 10 e

células humanas, bem como células vegetais em cultura de tecidos. Para expressão em células animais, são preferidas células CHO e células COS 7 em culturas e particularmente a linha de células CHO, CHO (DHFR-) ou a linha HKB.

Deve ser, obviamente, entendido que nem todos os vectores e sequências de controlo de expressão funcionarão igualmente bem, para expressar as sequências de ADN aqui descritas. Nem todos os hospedeiros funcionarão bem com o mesmo sistema de expressão. Todavia, um especialista na técnica pode fazer uma selecção entre estes vectores, sequências de controlo de expressão e hospedeiros sem experimentação desnecessária. Por exemplo, na selecção de um vector, o hospedeiro deve ser considerado, porque o vector deve replicar neste. O número de cópias do vector, a capacidade para controlar esse número de cópias e a expressão de quaisquer outras proteínas codificadas pelo vector, tais como marcadores de antibiótico, devem ser considerados. Por exemplo, vectores preferidos para utilização nesta invenção incluem aqueles que permitem que o ADN codificando as muteínas de IL-2 seja amplificado em número de cópias. Esses vectores amplificáveis são bem conhecidos na técnica. Eles incluem, por exemplo, vectores capazes de serem amplificados por amplificação de DHFR (ver, e. g., Kaufman, Patente dos Estado Unidos 4470461, *Kaufman and Sharp*, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", *Mol. Cell. Biol.*, **2**, pp.1304-19 (1982)) ou amplificação da sintetase de glutamina ("GS") (ver, e. g., Patente dos Estados Unidos 5122464 e Pedido de Patente Europeia publicado 338841).

Na selecção de uma sequência de controlo de expressão, também devem ser considerados uma variedade de factores. Estes

incluem, por exemplo, a força relativa da sequência, a sua capacidade para ser controlada e a sua compatibilidade com a verdadeira sequência de ADN codificando a muteína de IL-2 desta invenção, particularmente, em relação às potenciais estruturas secundárias. Os hospedeiros devem ser seleccionados em consideração à sua compatibilidade com o vector escolhido, a toxicidade do produto codificado pelas sequências de ADN desta invenção, as suas características de secreção, a sua capacidade para dobrar os polipéptidos correctamente, a sua fermentação ou requisitos de cultura e a facilidade de purificação dos produtos codificados pelas sequências de ADN.

Nestes parâmetros, um especialista na técnica pode seleccionar várias combinações de vector/sequência de controlo de expressão/hospedeiro que irão expressar as sequências de ADN desejadas em fermentação ou em cultura animal em larga escala, por exemplo, utilizando células CHO ou células COS 7.

As muteínas de IL-2, de acordo com a presente invenção, podem ser glicosiladas ou não glicosiladas, dependendo do organismo hospedeiro utilizado para produzir a muteína. Se as bactérias são escolhidas como o hospedeiro, então a muteína de IL-2 produzida será não glicosilada. As células eucariotas, por outro lado, irão glicosilar as muteínas de IL-2, embora talvez não do mesmo modo que a IL-2 nativa é glicosilada. A muteína de IL-2 produzida pelo hospedeiro transformado pode ser purificada de acordo com qualquer método adequado. São conhecidos vários métodos para purificar IL-2. Ver, e. g. *Current Protocols in Protein Science*, Vol 2. Eds: John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, Unidade 6.5 (Copyright 1997, John Wiley and Sons, Inc.). É preferida a remoldagem a partir de corpos de inclusão criados em *E. coli*, ou

a partir de meio condicionado quer de culturas de mamíferos ou leveduras produzindo uma dada muteína utilizando permuta catiónica, filtração em gel e/ou cromatografia reversa em fase líquida. Ver Exemplos 1 (*E. coli*) e 10 (perfusão de células CHO) abaixo.

A actividade biológica das muteínas de IL-2 desta invenção pode ser ensaiada por qualquer método adequado conhecido na técnica. Esses ensaios incluem proliferação de blastos de PHA e proliferação de células NK. As muteínas de actividade apropriada, *i. e.*, totalmente activas em IL-2 $\alpha\beta\gamma$, com actividade reduzidas nas células contendo IL-2 $\alpha\beta\gamma$, serão confirmadas utilizando os dois ensaios. A "actividade relativa" de uma muteína é medida em relação à IL-2 de tipo selvagem e como ainda descrito nos exemplos, é a proporção da actividade da proliferação de blastos de PHA em relação à proliferação de células NK.

A muteína de IL-2 desta invenção será administrada a uma dose, aproximadamente, paralela ou superior, à empregue na terapêutica com IL-2 nativa de tipo selvagem ou recombinante. É administrada, de uma forma preferida, uma quantidade eficaz da muteína de IL-2. Uma "quantidade eficaz" significa uma quantidade capaz de prevenir ou diminuir a severidade ou disseminação do estado ou indicação a serem tratados. Deve ser óbvio para um especialista na técnica que a quantidade eficaz de muteína de IL-2 irá depender, *inter alia*, da doença, dose, horário de administração da muteína de IL-2, quer a muteína de IL-2 seja administrada juntamente ou em conjunção com outros agentes terapêuticos, a semi-vida da composição no soro e a saúde geral do doente.

A muteína de IL-2 é administrada, de um modo preferido numa composição incluindo um veículo farmacêuticamente aceitável. "Veículo farmacêuticamente aceitável" significa um veículo que não provoca qualquer efeito adverso em doentes aos quais é administrado. Esses veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica. É preferido HSA a 2%/PBS a pH 7,0.

As muteínas de IL-2 da presente invenção podem ser formuladas em composições farmacêuticas por métodos bem conhecidos. Ver, e. g., Remington's Pharmaceutical Science por E.W. Martin, aqui incorporado por referência, descreve formulações adequadas. A composição farmacêutica da muteína de IL-2 pode ser formulada numa variedade de formas, incluindo líquido, gel, liofilizado ou qualquer outra forma adequada. A forma preferida dependerá da indicação particular a ser tratada e será óbvia para um especialista na técnica.

A composição farmacêutica da muteína de IL-2 pode ser administrada oralmente, por aerossol, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intradermicamente ou subcutaneamente ou em qualquer outro modo aceitável. O modo de administração preferido dependerá da indicação particular a ser tratada e será óbvia para um especialista na técnica. A composição farmacêutica da muteína de IL-2 pode ser administrada em conjunção com outros agentes terapêuticos. Os agentes podem ser incorporados como parte da mesma composição terapêutica ou podem ser administrados separadamente a partir da muteína de IL-2, quer concorrentemente ou de acordo com qualquer outro horário de tratamento aceitável. Adicionalmente, a composição farmacêutica de muteína de IL-2 pode ser utilizada como um auxiliar para outras terapêuticas.

Consequentemente, esta invenção proporciona composições e métodos para o tratamento de HIV, Cancro, doença auto-imune, doença infecciosa, adjuvante de vacina em vacina de Cancro e terapêutica de vacina convencional, para estimulação imunitária em idosos ou indivíduos de outra forma imunocomprometidos, assim como em doentes de SCID humanos, ou outra aplicação terapêutica requerendo estimulação geral do sistema imunitário em qualquer animal adequado, de um modo preferido, um mamífero, de um modo muito preferido, humano. Como anteriormente referido na secção dos Antecedentes, a IL-2 possui muitos efeitos. Alguns destes são a estimulação de blastos de PHA, células T em repouso, células B, monócitos e células NK, etc.; as muteínas aqui descritas terão actividades em tipos de células expressando apenas o receptor de IL-2 de afinidade elevada, tais como células T em repouso, mas não o receptor de IL-2 de afinidade intermédia, tal como células NK ou monócitos.

Está também contemplada a utilização das sequências de ADN codificando as muteínas de IL-2 desta invenção em aplicações de terapêutica génica. As aplicações de terapêutica génica contempladas incluem tratamento dessas doenças em que é esperado que IL-2 proporcione uma terapêutica eficaz devido à sua actividade de células T, e. g., HIV, Cancro, doença auto-imune, doença infecciosa, adjuvante em vacina de Cancro e terapêutica de vacina convencional, para imunoestimulação em idosos ou pessoas de outra forma imunocomprometidas, assim como doentes de SCID humanos e doenças que são, de outra forma, de reacção a IL-2 ou agentes infecciosos sensíveis a resposta imunitária mediada por IL-2.

A administração local das muteínas de IL-2 utilizando terapêutica génica pode proporcionar o agente terapêutico para a

área alvo. Estão contempladas tanto metodologias de terapêutica génica *in vitro* como *in vivo*. São conhecidos vários métodos para transferir genes potencialmente terapêuticos a populações de células definidas. Ver, e. g., Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", *Science*, **260**: 926-31 (1993). Estes métodos incluem:

1) Transferência directa de genes. Ver, e. g., Wolff *et al.*, "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", *Science*, **247**:1465-68 (1990);

2) Transferência de ADN mediada por lipossomas. Ver, e. g., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", *Nature Med.* **3**: 39-46 (1995); Crystal, "The gene As A Drug", *Nature Med.* **1**: 15-17 (1995); Gao e Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent for Efficient Transfection Of Mammalian Cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **179**:280-85 (1991);

3) Transferência de ADN mediada por retrovírus. Ver, e. g., Kay *et al.*, "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", *Science*, **262**: 117-19 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", *Science*, **256**: 808-13 (1992).

4) Transferência de ADN mediada por vírus. Esses vírus de ADN incluem adenovírus (de um modo preferido vectores baseados em Ad-2 ou Ad-5), vírus de herpes (de um modo preferido vectores baseados em vírus herpes simplex), e parvovírus (de um modo preferido vectores à base de parvovírus "defeituosos" ou não autónomos, de um modo mais preferido, vírus adeno-associados, de um modo muito preferido vectores à base de AAV-2). Ver, e. g.,

Ali e *tal.*, "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", *Gene Therapy*, **1**: 367-84 (1994); Patente dos Estados Unidos 4797368, aqui incorporado por referência e Patente dos Estados Unidos 5139941, aqui incorporados por referência.

A escolha de um sistema de vector particular para transferir o gene de interesse irá depender de uma variedade de factores. Um factor importante é a natureza da população de células alvo. Embora os vectores retrovirais tenham sido extensivamente estudados e utilizados numa variedade de aplicações de terapêutica génica, estes vectores são geralmente inadequados para infectar células que não estão em divisão. Adicionalmente, os retrovírus possuem o potencial para oncogenicidade.

Os adenovírus possuem a vantagem de possuir uma vasta gama de hospedeiros, podem infectar células inactivas ou diferenciadas terminalmente, tais como neurónios ou hepatócitos e parecem essencialmente como não oncogénicas. Ver, e. g., Ali *et al.*, *supra*, p. 367. Os adenovírus não parecem integrar-se no genoma do hospedeiro. Porque existem extracromossomicamente, o risco de mutagénese de inserção é fortemente reduzido. Ali *et al.*, *supra*, p. 373.

Os vírus adeno associados apresentam vantagens semelhantes aos vectores baseados em adenovírus. Todavia, os AAV exibem integração específica para um sítio no cromossoma humano 19. Ali *et al.*, *supra*, p. 377.

O ADN que codifica a muteína de IL-2 desta invenção pode ser utilizado em terapêutica génica para doenças de imunodeficiência, tais como HIV, doenças infecciosas, tais como tuberculose; e cancros, tais como carcinoma renal.

Consequentemente, a terapêutica génica com ADN codificando as muteínas de IL-2 desta invenção é proporcionada a um doente em necessidade deste, concorrentemente com, ou imediatamente após o diagnóstico.

Esta abordagem tira vantagem da actividade selectiva das muteínas de IL-2 desta invenção para evitar a toxicidade indesejada e eventos adversos. O especialista na técnica entenderá que qualquer vector de terapêutica génica adequada contendo ADN de muteína de IL-2 pode ser utilizado de acordo com esta forma de realização. As técnicas para construção de um tal vector são conhecidas. Ver, e. g., Anderson, W.F., Human Gene Therapy, *Nature*, **392** 25-30 (1998); Verma, I.M., e Somia, N., Gene Therapy - Promises, Problems, and Prospects, *Nature*, **389** 239-242 (1998). A introdução do vector contendo ADN de muteína de IL-2 no sítio alvo pode ser realizada utilizando técnicas conhecidas.

C. Exemplos

Exemplo 1. Produção de muteínas em *E. coli*. As muteínas foram criadas por mutagénese dirigida utilizando iniciadores contendo codões correspondendo à mutação desejada, essencialmente como descrito por Kunkel TA, Roberts JD, e Zakour RA, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" (1987), *Methods Enzymol* **154**: 367-382. Resumidamente, o ADNc de IL-2 humano contendo os sítios de enzima de restrição *Bam* HI e *Xba* I foi subclonado no vector do fago M13, M13 mp19 (New England Biolabs, Beverly, MA) utilizando os mesmos sítios. O ADNc de IL-2 de tipo selvagem foi obtido

utilizando a Reacção da Polimerase em Cadeia ("PCR") a partir de uma mistura de ADNc de ARNm isolado de linfócitos de sangue periférico humano induzido durante 24 horas com forbol 12-miristato 13-acetato (10 ng/mL). Os iniciadores de PCR utilizados foram, para a extremidade 5' da grelha de leitura aberta de IL-2,

5' -CTT CAA CTC CTG AAT TCA TGT ACA GGA TGC - 3' (SEQ ID N°3);

e para extremidade 3' da grelha de leitura aberta de IL-2,

5' -GGA AGC GGA TCC TTA TCA AGT CAG TGT TGA G-3' (SEQ ID N°4);

A enzima de restrição *Eco* RI (extremidade 5') e *Bam* HI (extremidade 3') foram incorporados em cada oligonucleótido e estão indicados em itálico. As condições da PCR foram 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58,7 °C e 1 minuto a 72 °C durante 25 ciclos. A sequência correcta de ADNc de IL-2 assim obtida foi confirmada por sequenciação utilizando o kit de sequenciação Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL), como descrito pelo fabricante. Foi obtido ADN de cadeia simples contendo uracilo (U-ADN) transformando a estirpe de *E. coli* CJ236 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) com M13 np19 contendo ADNc de IL-2. A mutagénese dirigida utilizou em geral iniciadores contendo 15 nucleótidos homólogos ao U-ADN molde a 5' para o(s) codão(ões) direccionados pela mutagénese, nucleótidos que incorporam a alteração desejada e 10 nucleótidos homólogos adicionais para o U-ADN molde a 3' do último nucleótido alterado. Inicialmente, a mutagénese dirigida foi utilizada para introduzir um sítio de restrição *Nco* I no início da sequência madura de IL-2 humana. A utilização deste sítio de restrição incorpora um resíduo de metionina N-terminal que irá dirigir a

expressão no espaço citoplásmico de *E. coli* utilizando, por exemplo, o vector de expressão pET3d. O iniciador utilizado para este objectivo foi:

5' -GCA CTT GTC ACA AAC ACC ATG GCA CCT ACT TCA AGT-3' (SEQ ID N°:5)

Os iniciadores específicos utilizados para incorporar mutações nas posições D20, N88 e Q126 foram:

D20X: 5' -GGA GCA TTT ACT GCT GNN NTT ACA GAT G -3' (SEQ ID N°:6)

N88X: 5' -GGG ACT TAA TCA GCN NNA TCA ACG TAA TAG -3' (SEQ ID N°:7)

Q126X: 5'-GGA TTA CCT TTT GTN NNA GCA TCA TCT C -3' (SEQ ID N°:8)

quando o NNN foi substituído com um codão apropriado para a Histidina (CAC) ou Isoleucina (ATC) (na posição D20), arginina (CGT), glicina (GGT), ou isoleucina (ATC) (na posição N88), ou leucina (CTG) (na posição Q126). Outras mutações utilizaram uma estratégia semelhante e um codão apropriado para uma dada mutação. Os iniciadores foram fosforilados utilizando cinase de polinucleótido de T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) utilizando o protocolo do fabricante. Após o emparelhamento do iniciador com o U-ADN molde e extensão com polimerase de ADN de T7 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), células da estirpe de *E. coli* DH5 α TM (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) foram transformadas com 5 μ L de mistura de reacção e plaqueadas em meio LB contendo agar a 0,7%. Após a incubação a 37 °C as placas foram expandidas repicando uma placa única e transferindo para 2 mL de meio LB e crescimento durante a noite a 37 °C. O ADN de cadeia simples foi isolado utilizando um kit de purificação de M13 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) seguindo o protocolo do fabricante e clones contendo a mutação desejada foram identificados sequenciando o ADN de cadeia simples, utilizando o kit de sequenciação

Sequenase[®] (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) seguindo o protocolo do fabricante. O ADN da Forma Replicativa de ADNc de muteína de IL-2 correspondendo a placas contendo a sequência mutada correcta foi isolado utilizando *Nco* I e *Xba* I e subclonado no vector plasmídico pET3a (Stratagene, San Diego, CA) (Strat). A estirpe de *E. coli* BL2I foi transformada com o vector pET3a contendo muteína e cultivada até uma ABS₂₈₀ entre 0,60 e 1,0 em cujo momento foi adicionado IPTG a 0,4 mM para induzir a muteína de IL-2.

Exemplo 2. Extracção e Purificação de muteínas de IL-2 de *E. coli*.

Três horas após a indução as células foram recolhidas por centrifugação a 10 000 X g. As muteínas de IL-2 recombinantes foram renaturadas e purificadas primeiro dispersando as células em 10 volumes (vol./massa húmida) de tampão sacarose/Tris/EDTA (sacarose a 0,375 M, Tris/HCl pH 8,0, EDTA a 1 mM). As células dispersas foram sonicadas 3 vezes a 300 W com intervalos de repouso de 30 segundos num banho de gelo, utilizando um sonicador Missonix modelo XL2020 equipado com uma sonda convencional de 1 polegada. O material sonicado foi então centrifugado a 17000 x g durante 20 minutos a 4 °C. O sedimento, que deve ter uma cor branca nesta altura, foi lavado por ressuspensão e centrifugação uma vez com tampão sacarose/Tris/EDTA, duas vezes com tampão Tris/EDTA (Tris a 50 mM/HCl pH 8,0, EDTA a 1 mM) e finalmente ressuspensão em 10 vol de tampão Tris a 0,1 M/HCl, pH 8,0 (a amostra é retirada nesta altura para análise em gel) e centrifugada durante 20 minutos a 17000 x g.

O sedimento foi dissolvido adicionando 3 volumes de cloreto de guanidínio a 8 M em Tris a 0,1 M/HCl (pH 8,0), e 2-mercaptoetanol a 0,1% (vol/vol). Após incubação durante 2 horas à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 17 000 x g. A solução resultante foi dialisada durante aproximadamente 20 horas contra 20 volumes de Tris HCl a 10 mM/HCl, pH 8,0, EDTA a 1 mM a 4 °C. A solução foi centrifugada a 17 000 x g durante 20 minutos, ajustada para 0,1% de ácido trifluoroacético e filtrada numa unidade de filtração de 0,22 micron. A solução foi transferida imediatamente para um frasco siliconizado e carregada numa coluna C8 (Vydac 208TP54). As muteínas de IL-2 foram purificadas utilizando um gradiente linear durante 20 minutos utilizando acetonitrilo a 45-85% em TFA a 1%. A concentração da proteína eluída foi determinada por A280 e análise de aminoácidos. A proteína foi então repartida em fracções (100 mL) em tubos siliconizados e armazenada a -20 graus Celsius. A muteína assim purificada foi tipicamente uma banda única como observado por SDS-PAGE (coloração com prata) e foi quantificada por análise de aminoácidos (precisão tipicamente >90%).

Exemplo 3. Ensaio de proliferação de células T.

Foram isoladas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) a partir de aproximadamente 100 mL de sangue humano normal (Irwin Memorial Blood Bank, São Francisco, CA) diluído 1:2 em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco frio (Ca^{2+} e sem Mg^{2+} ; DPBS). É colocado uma camada inferior de Ficoll-Paque (Pharmacia) e a amostra é centrifugada para isolar as PBMC, seguido por lavagens prolongadas em DPBS frio. Foram criados blastos de PHA (células T activadas) ressuspensando as

células em RPMI 1640 contendo 10% soro de bovino fetal (Hyclone), ao qual é adicionado 1% (p/v) de cada um dos seguintes: L-glutamina; aminoácidos não essenciais; piruvato de sódio; e antibiótico-antimicótico (meio RPMI) a uma densidade de 1×10^6 células/mL. Foi adicionada fito-hemaglutanina (PHA-P; Sigma) a uma concentração final de 10 µg/mL, e as células foram incubadas a 37 °C, CO₂ a 5% durante 3 dias. As células foram recolhidas e lavadas duas vezes em DPBS, ressuspensas em meio RPMI e plaqueadas em placas de fundo liso de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço em 200 µL com concentrações variadas de IL-2 ou muteína em meio RPMI. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37 °C, pulsadas com 1 µCi de ³H-timidina (DuPont NEN®, Boston, MA)/poço durante 6 horas, recolhidas, e a radioactividade foi medida após a recolha das células para filtros de fibra de vidro.

Exemplo 4. Ensaio de proliferação de células NK.

Foram isoladas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) a partir de aproximadamente 100 mL de sangue humano normal (Irwin Memorial Blood Bank, São Francisco, CA) diluído 1:2 em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco frio (Ca²⁺ e sem Mg²⁺; DPBS). É colocado uma camada inferior de Ficoll-Paque (Pharmacia) e a amostra é centrifugada para isolar as PBMC, seguido por lavagens prolongadas em DPBS frio. As células NK foram separadas das outras células. O kit de isolamento de células Miltenyi Biotec's NK (Bergisch Gladbach, Alemanha; Cat#; 465-01) é preferido para este objectivo. O kit consiste em dois reagentes, colunas de separação e um suporte de coluna magnética muito potente. O primeiro reagente é uma mistura de anticorpos monoclonais conjugados com hapteno CD3, CD4, CD19, CD33 de

isotipo IgG1 de murganho. Isto é para reduzir as PMBC das células T, células B e células mielóides. É contemplado que qualquer conjunto adequado de anticorpos que reconheçam estes tipos de células possam ser utilizadas. O segundo reagente consiste em microesferas coloidais super-paramagnéticas MACs conjugadas com um anticorpo anti-hapteno. As células são ressuspensas em PBS com albumina de soro bovino a 0,5% e EDTA a 2 mM (PBS/EDTA). O volume da suspensão está dependente do número de células utilizado e é proporcionado num gráfico por Miltenyi Biotec. Tipicamente, com um número de células de 2 a 5 x 10⁸ PBMC, as células são ressuspensas em 800 µL do tampão e depois é utilizado 200 µL de cada reagente. Após incubação com os reagentes, as células são adicionadas à coluna (ressuspensas em 2 mL de tampão). As células não NK aderem ao magnete (reduzidas) e as células NK são isoladas e recolhidas no fluxo de passagem. As células são lavadas, ressuspensas em meio RPMI (contém: RPMI 1640, ao qual é adicionado 1% de cada um dos seguintes: L-glutamina; aminoácidos não essenciais; piruvato de sódio; antibiótico-antimicótico (todos da Gibco/BRL, Gaithersburg, MD); soro de bovino fetal a 10% (Hyclone)), e plaqueadas em placas de fundo liso de 96 poços a uma densidade de 1 X 10⁵ células/poço em 200 µL. As células foram recolhidas e lavadas duas vezes em DPBS, ressuspensas em meio RPMI e plaqueadas em placas de fundo liso de 96 poços a uma densidade de 1 X 10⁵ células/poço em 200 µL com concentrações variadas de IL-2 ou muteína em meio RPMI. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37 °C, pulsadas com 1 µCi de ³H-timidina (DuPont NEN®, tal , MA)/poço durante 6 horas, recolhidas, e a radioactividade foi medida após recolha das células para filtros de fibra de vidro.

Exemplo 5. Muteínas que activam selectivamente células T em relação a células NK.

As muteínas foram geradas utilizando mutagénese dirigida (Kunkel *tal* (1987), *Methods Enzymol* **154**:367-382) nas posições Asp-20, Asp-84, Asn-88, e Gln-126, e foram expressas em *E. coli* utilizando o sistema de expressão de pET-3^a como descrito pelo fabricante (Stratagene). As muteínas foram purificadas pela recuperação de corpos de inclusão em guanidina-HCL, remoldadas, e cromatografadas utilizando HPLC, como descrito anteriormente. A proteína resultante resultou >95% pura por SDS-PAGE corada com prata, e foi analisada quanto à concentração e pureza por análise de aminoácidos (precisão de AAA tipicamente > 90%). As muteínas possuindo actividade apropriada foram confirmadas em sequência utilizando análise de espectroscopia de massa. As muteínas assim purificadas foram ensaiadas nos ensaios de células T e NK previamente descritos. As actividades relativas para as muteínas de IL-2 nos ensaios de células T e NK estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1-Muteínas avaliadas para a actividade selectiva de células T

Muteína	actividade relativa		actividade relativa	
	Células T vs. NK	Células T	Células NK	
IL-2 selvagem	1	100000	1,00000	
Muteínas D20				
D20A	5	0,00024	0,00005	
D20H	3900	0,37081	0,00009	
D20I	7600	4,59635	0,00061	
D20K	330	0,06301	0,00019	
D20L	100	0,00063	0,00001	
D20M	490	0,05372	0,00011	
D20N	160	0,03000	0,00019	
D20Q	100	0,03180	0,00032	
D20R	33	0,00018	0,00001	
D20S	170	0,06640	0,00038	
D20T	1	1,00000	1,00000	
D20V	10	0,00093	0,00009	
D20Y	1000	0,06587	0,00007	
Muteínas N88				
N88A	50	0,50000	0,01	
N88E	10	0,01172	0,00115	
N88F	22	0,02222	0,001	
N88G	980	8,33333	0,00853	
N88H	3	0,00100	0,001	
N88I	9600	0,98074	0,00010	
N88K	3	0,00010	0,00032	
N88L	4	0,00400	0,001	
N88M	250	0,25000	0,001	
N88R	6200	0,89730	0,00015	

(continuação)

Muteína	actividade relativa		actividade relativa	
	Células T vs. NK	Células T	Células NK	
N88S	80	0,00200	0,16000	
N88T	395	0,50000	0,001266	
N88V	67	0,06670	0,001	
N88W	1	0,00100	0,001	
N88Y	8	0,00800	0,001	
Muteínas Q126				
Q126A	0,30	0,01743	0,05809	
Q126D	240	0,14630	0,00061	
Q126E	400	10,0000	0,02500	
Q126F	32	0,97358	0,02749	
Q126G	100	0,55556	0,00556	
Q126H	0,03	0,02216	0,73875	
Q126I	33	0,00100	0,00003	
Q126K	1,0	1,00000	1,00000	
Q126L	680	3,06186	0,00447	
Q126M	9,1	19,94092	2,19298	
Q126N	10	6,57895	0,64993	
Q126P	3,0	0,00032	0,00011	
Q126R	11	4,02695	0,36392	
Q126S	33	0,03417	0,00103	
Q126T	3,3	0,00010	0,00003	
Q126V	330	1,00556	0,00302	
Q126W	1,0	0,20000	0,20000	
Q126Y	10	0,88500	0,08850	

As actividades das muteínas são descritas em termos da concentração relativa de muteína necessária para originar uma

resposta máxima de 50% (EC_{50}) em comparação com a EC_{50} de IL-2 selvagem no mesmo ensaio; no caso de ensaios múltiplos na mesma muteína, são listadas as médias geométricas dos valores. Os valores de EC_{50} para a IL-2 de tipo selvagem variou entre ~10 pM e 150 pM no ensaio de células T, e ~50 pM e ~200 pM no ensaio de células NK. A proporção da actividade de muteínas em células T vs. células NK é expressa como a actividade relativa da muteína em células T dividida pela actividade relativa da muteína em células NK. Esta proporção é determinada para cada muteína utilizando apenas a actividade determinada de determinados ensaios de células T e NK utilizando células de um único dador.

As actividades de muteína podem ser classificadas em 6 categorias vastas: 1) selectividade de células T de 1000 vezes; 2) selectividade de células T de 100-but < 1000 vezes; 3) selectividade de células T de 10-but < 100 vezes; 4) actividade relativa melhorada para IL-2 em células T; 5) selectividade de células NK; 6) 10fold selectividade de 10 vezes quer para células T ou NK.

Classe 1: D20H, I, e Y; N88G, I, e R.

Classe 2: D20K, L, M, N, Q, e S; N88M e T; Q126D, E, G, L, e V.

Classe 3: D20R; N88A, E, F, S e V; Q126F, I, N, R e S.

Classe 4: D20I; N88G; Q126E, L, M, N, e R.

Classe 5: Q126A, H.

Classe 6: D20A, T, e V; N88H, K, L, W, e Y; Q126K, P, T, W, e Y.

Nas Classes 1-3, as muteínas preferidas são aquelas que apresentam actividade próxima de IL-2 de tipo selvagem ou superior em células T. Na Classe 1, isto incluiria D20H e I;

N88G,I, e R; na Classe 2, isto inclui N88M e T, Q126D, E, G, L e V; na Classe 3, isto inclui N88A, Q126F e G. Prevê-se que as muteínas na Classe 4 tenham maior potência do que a IL-2 de tipo selvagem *in vivo*.

Pode observar-se na Tabela 1 que nenhuma mutação única resultou numa muteína de IL-2 inactiva em ambos os ensaios. Todavia, pode ser derivado que uma combinação de mutações que resultaram em actividade gravemente comprometida a partir de duas posições diferentes iria potencialmente produzir uma actividade de IL-2 antagonista em células T, ou outros tipos de células comportando receptor de IL-2 de afinidade elevada. Prevê-se um tal antagonista a partir destes resultados, na medida em que as mutações foram concebidas para alterar apenas interacções com IL-2R β e IL-2R γ . Um tal exemplo seria a dupla muteína D20R/Q126T. A combinação de mutações fracamente activas numa molécula é prevista como sendo combinatória na natureza, isto é, a D20R possui 0,00018 de actividade em células T, Q126T 0,0001 de actividade em células T, esperar-se-ia que a dupla muteína D20R/Q126T tivesse 0,000000018 da actividade de IL-2 de tipo selvagem em células T. Outras combinações podem ser extraídas a partir dos resultados proporcionados.

Exemplo 6. Actividade biológica de IL-2 de tipo selvagem e muteínas de IL-2.

As figuras 1 a 7 apresentam as curvas de dose-resposta de IL-2 humana de tipo selvagem (IL-2) e D20H (Fig. 1), IL-2 e D20I (Fig. 2), IL-2 e N88G (Fig. 3), IL-2 e N88I (Fig. 4), IL-2 e N88R (Fig. 5), IL-2 e Q126E, (Fig. 6), e IL-2 e Q126L (Fig. 7).

A: Resposta a dose individual de IL-2 (círculos a preto) e

muteína (círculos a branco) no ensaio de proliferação de células T humanas primário (blastos de PHA). **B:** Resposta a dose individual de IL-2 (triângulos a preto) e muteína (triângulos a branco) no ensaio de proliferação de células NK humanas primário.

Particularmente, em relação à Fig. 1, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 selvagem que origina proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M para o ensaio das células T (A) e $\sim 1 \times 10^{-10}$ M para o das células NK (B). A EC_{50} para D20H foi de $\sim 2 \times 10^{-10}$ M neste ensaio de células T, mas estimada para ser $> 1 \times 10^{-5}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de D20H em relação à actividade de células NK é assim > 50000 vezes, como determinado para este ensaio. São obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Particularmente, em relação à Fig. 2, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 de tipo selvagem que produz uma proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M para o ensaio das células T (A) e $\sim 3 \times 10^{-10}$ M para o ensaio das células NK (B). A EC_{50} para D20I foi também $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M neste ensaio de células T, mas estimada como sendo de apenas $\sim 5 \times 10^{-6}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de D20I em relação à actividade de células NK é assim de ~ 16000 vezes, como determinado para este ensaio. Foram obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Particularmente, em relação à Fig. 3, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 de tipo selvagem que produz proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 4 \times 10^{-11}$ M para o ensaio de

células T (A) e $\sim 2 \times 10^{-10}$ M para o ensaio de células NK (B). A EC_{50} para N88G foi $\sim 5 \times 10^{-12}$ M neste ensaio de células T, mas estimada como sendo apenas $\sim 3 \times 10^{-8}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de N88G em relação à actividade de células NK é então ~ 1200 vezes, como determinado para este ensaio. Foram obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Particularmente, em relação à Fig. 4, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 de tipo selvagem que produz proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M para o ensaio de células T (A) e $\sim 1 \times 10^{-10}$ M para o ensaio de células NK (B). A EC_{50} para N88I foi $\sim 4 \times 10^{10}$ M neste ensaio de células T, mas estimada como sendo apenas $\sim 5 \times 10^{-6}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de N88I em relação à actividade de células NK é então ~ 18000 vezes, como determinado para este ensaio. Foram obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados). Foram obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Particularmente, em relação à Fig.5, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 de tipo selvagem que produz proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 1,5 \times 10^{-10}$ M para o ensaio de células T (A) e $\sim 1 \times 10^{-10}$ M para o ensaio de células NK (B). A EC_{50} para N88R foi $\sim 9 \times 10^{-11}$ M neste ensaio de células T, mas estimada como sendo apenas $\sim 3 \times 10^{-7}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de N88R em relação à actividade de células NK é assim de ~ 5000 vezes, como determinado para este ensaio. Foram obtidos resultados

semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Particularmente, em relação à Fig. 6, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 de tipo selvagem que produz proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 8 \times 10^{-12}$ M para o ensaio de células T (A) e $\sim 5 \times 10^{-11}$ M para o ensaio de células NK (B). A EC_{50} para Q126E foi $\sim 8 \times 10^{-13}$ M neste ensaio de células T, mas estimada como sendo apenas $\sim 2 \times 10^{-9}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de Q126E em relação à actividade de células NK é assim ~ 400 vezes, como determinado para este ensaio. Foram obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Particularmente, em relação à Fig. 7, para a experiência apresentada, a dose de IL-2 de tipo selvagem que produz proliferação máxima de 50% (EC_{50}) é $\sim 5 \times 10^{-11}$ M para o ensaio de células T (A) e $\sim 8 \times 10^{-11}$ M para o ensaio de células NK (B). A EC_{50} para Q126L foi $\sim 2 \times 10^{-11}$ M neste ensaio de células T, mas estimada como sendo apenas $\sim 2 \times 10^{-8}$ M neste ensaio de células NK. O melhoramento líquido na actividade de células T de Q 126L em relação à actividade de células NK é assim ~ 625 vezes como determinado para este ensaio. Foram obtidos resultados semelhantes com sangue de dadores adicionais (resultados não apresentados).

Exemplo 7. Estudos de Toxicidade em Chimpanzés.

Foi seleccionado IL-2/N88R das proteínas de mutante IL-2 na Tabela 1 devido à sua demonstrada actividade agonista selectiva

de células T em ensaios de células T e NK humanas primárias. Em relação a IL-2 de tipo selvagem, é ~6000 vezes mais activa em células T do que em células NK, e apresenta actividade essencialmente equivalente a IL-2 de tipo selvagem em células T. IL-2/N88R foi produzida em células CHO, purificada, e avaliada num modelo de chimpanzé de actividade e toxicidade de IL-2. Neste modelo *in vivo*, é exibida actividade de células T comparável a uma variante recombinante comercialmente disponível de IL-2 (PROLEUKINTM, Chiron Corporation, Emeryville, CA), ainda assim induziu apenas efeitos colaterais ligeiros em comparação (ambos em termos de parâmetros objectivos e clínicos).

A. Concepção Experimental

1. Materiais e Métodos

A porção, em vida, do estudo ocorreu na New Iberia Research Center (New Iberia, LA, Sponsor Bayer Corporation, Berkeley, CA) e envolveu duas fases de estudos e 11 chimpanzés machos adultos jovens com pesos corporais que variaram desde cerca de 45 até 70 kg.

A fase I do estudo foi uma fase de determinação da dose e envolveu distribuição de uma dose subcutânea de um transportador ou uma dose subcutânea de PROLEUKIN a 1,2 mg/m², duas vezes por dia (BID) durante 5 dias. A fase II deste estudo é uma comparação do veículo, PROLEUKIN, e IL-2/N88R administrados subcutaneamente, a cada 12 horas (q12 h) durante 5 dias. A dose de IL-2/N88R foi seleccionada para proporcionar exposição comparável a PROLEUKIN com base na análise farmacocinética. Foram retiradas amostras de sangue para análise de química do

sangue, CBC, hematologia/coagulação, e análise de FACS de populações de células T e NK, como explicado nas Secções 5 e 6.

Tabela 2A. Protocolo da Fase I

Número do Grupo	Número de Animais	Artigo de Teste	Dose	Frequência
1	1	Transportador	NA	BID durante 5 dias
2	2	PROLEUKIN	1,2 mg/m ²	BID durante 5 dias

Tabela 2B: Protocolo da Fase II

Número do Grupo	Número de Animais	Artigo de Teste	Dose	Frequência
1	1	Transportador	2,4 mL/m ²	q12 h durante 5 dias
2	2	PROLEUKIN	1,2 mg/m ²	q12 h durante 5 dias
3	3	IL-2/N88R	1,2 mg/m ²	q12 h durante 5 dias

2. Processo de Doseamento

Nos dias do estudo em que o sangue devia ser obtido, os animais foram completamente anestesiados utilizando cetamina IM a uma dose de aproximadamente 10 mg/kg antes da administração do

artigo de teste ou veículo. Nos dias de estudo em que a amostragem de sangue não era necessária, os animais foram fisicamente controlados utilizando uma gaiola de compressão antes da administração do artigo de teste ou transportador. A dose foi administrada por injeção subcutânea a cada 12 horas durante 5 dias, e foi rapado o pêlo no local da injeção no Dia 1 do estudo. O sítio e tempo de doseamento foi registado para cada dose.

3. Observações Clínicas

(a) Observações Diárias e Consumo de Alimentos. Cada animal foi observado duas vezes por dia e qualquer observação anormal foi relatada ao Director do Estudo. Os animais que pareciam doentes foram levados à atenção do Director do Estudo, Veterinário do Projecto, e o Representante dos Patrocinadores. O consumo de alimentos foi confirmado e registado duas vezes por dia, por observação visual.

(b) Pesos Corporais. Os pesos corporais foram registados antes do estudo, antes do doseamento do dia 1, e cada vez que os animais foram sedados para recolha de sangue.

(c) Observação de Locais de Injecção. Os locais das injeções foram observados diariamente. Quaisquer aparências anormais, tais como vermelhidão ou inchaço foram registadas.

Tabela 3A: Horário para a recolha de amostras da Fase II

Tempo	CBC	CHEM	COAG	FACS	ENSAIO DO PATROCINADOR
Pré-estudo	X	X	X	X	X
Dia 1, pré-dose	X	X	X	X	X
Dia 1, 15 min					X
Dia 3, pré-dose	X	X	X	X	X
Dia 3, 15 min					X
Dia 6	X	X	X	X	X
Dia 8	X	X	X	X	X
Dia 10	X	X	X	X	X
Dia 12	X	X	X	X	X
Dia 15	X	X	X	X	X
Dia 30	X	X	X	X	X

4. Manuseamento da amostra

(a) Química do Soro. Foram recolhidas amostras de sangue de, aproximadamente, 2 mL de cada animal para tubos sem anticoagulante nos pontos de tempo especificados acima. Os tempos da recolha de sangue foram documentados e o sangue foi deixado coagular à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas, o soro foi separado e despachado para o Laboratório de Patologia Clínica do NIRC. O painel de química do soro padrão do NIRC está incluído na Tabela 4:

Tabela 4: Painel da Química do Sangue

Sódio	Fósforo
Potássio	Azoto de Ureia
Cloreto	Creatinina
Bilirrubina Total	Proteína Total
Fosfatase Alcalina	Albumina
Desidrogenase do Lactato (LDH)	Proporção Albumina/Globulina
Aminotransferase de Aspartato (AST)	Glucose
Aminotransferase de Alanina (ALT)	Cálcio
Dióxido de Carbono (CO ₂)	Transferase de Gama-glutamil (GGT)

(b) Hematologia. Foram recolhidas amostras de aproximadamente 2 mL de sangue para cada animal em tubos com EDTA nos pontos de tempo especificados acima e enviados para o Laboratório de Patologia Clínica do NIRC. O painel de hematologia padrão do NIRC, incluindo contagem de sangue completa, contagem diferencial e de plaquetas, foram corridas em todas as amostras.

(c) Ensaio do Patrocinador. Foram recolhidas amostras de sangue de, aproximadamente, 6 mL para tubos com EDTA como um anticoagulante nos tempos especificados acima. Os tempos de recolha de sangue foram documentados. As amostras foram centrifugadas, o plasma foi separado e dividido em fracções para três tubos separados. O plasma foi armazenado congelado (-60 °C

ou inferior) e enviado para a Bayer Corporation, Berkeley, CA assim que o estudo foi completado

5. FACS

(a) Processo. Foi recolhida uma amostra de aproximadamente 5 mL de sangue em anticoagulante de heparina de sódio nos tempos especificados para análise de FACS.

Foi obtido um espécimen de sangue total em EDTA, ACD ou heparina. Os números de células foram ajustados para estarem no intervalo de 2 a 20 mil por mm³.

Tubos de 12 X 75 de vidro ou plástico foram marcados apropriadamente para o painel de anticorpo a ser corrido. Foi adicionado anticorpo ou cocktail de anticorpos aos tubos seguindo os volumes sugeridos pelo fabricante.

Foi adicionado 100 µL por tubo de espécimen de sangue bem misturado e a mistura foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente, protegida da luz.

Após incubação, foram adicionados 2 mL de solução de lise (Becton Dickinson FACS brand lysing solution, BD#92-0002), a mistura foi agitada em vórtice suavemente e deixada em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados à temperatura ambiente durante 5 minutos a 300 X g. Os sobrenadantes foram decantados, o excesso de líquido foi guardado em frasco e foi adicionado 1 mL de tampão PBS (GIBCO 14190-144) a cada sedimento celular. Após uma agitação suave em vórtice, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente

durante 5 min a 300 X g. Os sobrenadantes foram decantados, o excesso de líquido foi guardado em frasco antes de adicionar 1 mL de solução de fixação (solução de formaldeído a 0,5%, preparada diluindo formaldeído a 10% (Polyscience, Inc. #0418) 1:20 com tampão PBS) no sedimento celular e agitar em vórtice suavemente para ressuspensão. As amostras foram então analisadas num Citómetro de Fluxo Coulter EPICS SL.

Anticorpos utilizados para o estudo: isotipo de controlo MIgG1/MIgG1 (Becton Dickinson, Cat. #349526), CD45-PerCP (Becton Dickinson, Cat. #347464), CD8-FITC (Becton Dickinson, Cat. #347313), CD25-PE (Becton Dickinson, Cat. #30795X), CD4-FITC (Becton Dickinson, Cat. #340133), CD16-PE (Pharmingen, Cat. #347617), CD3-PerCP (Becton Dickinson, Cat. #347344).

6. Perfil de Coagulação

Foi recolhida uma amostra de aproximadamente 2 mL de sangue total para tubos com citrato de sódio adicionado como um anticoagulante nos pontos de tempo acima especificados. O perfil de coagulação consistiu no Tempo de Protrombina (PT), Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) e Fibrinogénio.

B. Resultados e Discussão

1. Determinação da Dose de PROLEUKIN

O objectivo principal desta fase foi identificar uma dose óptima de PROLEUKIN para comparação com IL-2/N88R. Esta dose óptima de PROLEUKIN foi direccionada para ser uma dose tolerante

(inferior à dose máxima tolerada) que, idealmente, provocará toxicidade clinicamente significativa, mas moderada e reversível. Uma dose de PROLEUKIN de $1,2 \text{ mg/M}^2$, BID, foi determinada como a dose inicial com base na extrapolação de cruzamento de espécies dados os regimes de dose clínica de PROLEUKIN, as suas toxicidades correspondentes, e resultados de resposta à dose em macacos cinomólogos em cativeiro.

Foram tratados dois chimpanzés deste modo com PROLEUKIN. Estes animais tornaram-se progressivamente menos activos, prostrados, e desidratados ao longo do decurso do doseamento. Ambos os animais desenvolveram vários sintomas gastrointestinais começando nos dias 3 ou 4, incluindo apetite reduzido, diarreia, vômito. O doseamento num animal (número X-159) foi descontinuado após 3 dias de doseamento devido a disfunção renal grave (Figura 8A e B) e hepática moderada (Figura 8C e D) reflectida nas químicas da química do sangue. Estas incluem aumentos do azoto de ureia no sangue (BUN), creatinina, e bilirrubina total, ALT (SGPT). Foi administrada solução de Ringers Lactada i.v. tanto para ambos os animais tratados com PROLEUKIN no dia 3 e 4 (animal X-159) e apenas no dia 4 (animal X-124) como ressuscitação ou para evitar maior desidratação. O animal número X-159 foi removido do estudo no dia 8 devido a disfunção renal e possível trombo na perna direita, como indicado por uma pulsação muito fraca (femoral), e a coxa inteira esta fria e inchada. Embora tenha sido observada toxicidade significativa num animal, o outro animal sofreu eventos menos graves e o perfil de eventos adversos para ambos os animais foi reversível. Com base nisto, $1,2 \text{ mg/M}^2$ de PROLEUKIN e a dose equivalente (com base na exposição) de IL-2/N88R, q12 h foi determinada como sendo um regime de dose apropriado para comparar estes dois compostos.

2. Comparação de IL-2/N88R com PROLEUKIN

Observações Clínicas. A Tabela 5 lista as observações clínicas realizadas durante o estudo. Os valores são relatados numa escala de 0 a 5, em que 5 é grave. Todos os animais tratados com PROLEUKIN ficaram gravemente doentes; ocorreu uma morte associada ao tratamento com PROLEUKIN. Os valores relatados após o dia 6 para o grupo de PROLEUKIN reflectiram os resultados dos dois animais restantes. O efeito colateral mais óbvio de tratamento com IL-2/N88R pareceu ser um distúrbio de GI suave (emese) embora o tratamento tenha induzido toxicidade nominal em termos dos parâmetros indicados na Tabela 4. O peso corporal do grupo PROLEUKIN caiu 6% no dia 6 e caiu até 10% no dia 10 e recuperou lentamente a partir daí (ver Figura 9). Em contraste, IL-2/N88R e os grupos de veículo tinham meramente 1-3% de perda de peso, no máximo.

Tabela 5. Observações clínicas*

Tratamento	Estado Geral	Perda de Apetite	Letargia	GI	Depressão
IL-2/N88R	bom	1	1	2	1
PROLEUKIN	gravemente doente	5	4/5	5	4/5
Transportador	normal	0	0	0	0

*Escala de 0 a 5, em que 5 é muito grave

(a) Hematologia. Também foram observados efeitos celulares induzidos por IL-2/N88R consistentes com a activação de PROLEUKIN, em particular linfocitose (Figura 10A), aumento dos glóbulos brancos (Figura 10B) e neutrófilos (Figura 10C.).

IL-2/N88R induziu apenas uma trombocitopenia marginal (nadir de ~15%) comparada com a PROLEUKIN (nadir de ~50%) durante a porção de tratamento do estudo (Figura 10D).

(b) Função Renal. Os níveis de BUN foram marcadamente mais elevados em todos os animais tratados com Proelukin nos dias 6 e 8 (Figura 11A). Os níveis de BUN foram superiores a 130 mg/dL em dois destes animais; Os níveis de creatinina também aumentaram dramaticamente nos dois animais em ambos os dias 6 e 8 (Figura 11B) indicando um fecho completo da função renal. Adicionalmente, tanto o fósforo do soro como o intervalo aniônico também aumentaram no grupo tratado com PROLEUKIN nos dias 6 e 8. Em contraste, em todos os animais tratados com IL-2/N88R, estes parâmetros renais permaneceram basicamente normais ao longo do estudo (Figura 11C e D).

(c) Função Hepática. A bilirrubina total mais do que triplicou no grupo de PROLEUKIN no dia 6 e permaneceu elevada até ao dia 10 (Figura 12A). Em contraste, apenas um animal no grupo IL-2/N88R teve um aumento passageiro, menor nos dias 3 e 6. O nível de SGPT no soro elevou dramaticamente e atingiu mais de 100 U/L em todos os animais tratados com PROLEUKIN no dia 6 (Figura 12B). O nível de SGPT no animal número A199 alcançou 651 U/L, e o SGOT 2789 U/L (Livro de Notas do Lab: NIRC#8754-9852-Fase II, Tabela 1 Valores Médios da Química Individuais e de Grupo, página 17 de 21 da tabela), indicando uma falha hepática grave.

(d) Coagulação. O Nível de Fibrinogénio mais do que duplicou em ambos os grupos de PROLEUKIN e IL-2/N88R e tiveram um pico no dia 6 (Figura 12C). O aumento parece ter acontecido mais cedo no grupo PROLEUKIN do que nos animais de IL-2/N88R. Isto é

reflectido por um aumento de 51% vs. 5% no dia 3. As alterações no fibrinogénio podem ser um resultado de resposta de proteína aguda mais do que defeitos de coagulação uma vez que não existem alterações significativas no APTT ou PT consequentemente, durante o mesmo período de tempo (Figura 12D). Todavia, começando no dia 10, o nível de APTT nos animais de PROLEUKIN demonstraram uma tendência óbvia, embora o valor absoluto tenha permanecido no intervalo normal. A mesma tendência, embora numa extensão menor, foi também observada no grupo IL-2/N88R. Todavia, um aspecto interessante é que o nível de fibrinogénio parece ter deslizado para baixo durante o mesmo período de tempo, como consequência em ambos os grupos.

(e) Homeostasia. Os níveis de sódio no soro diminuíram para menos de 135 MEQ/L em dois dos três animais com PROLEUKIN no dia 8, mas permaneceram normais no resto dos animais (Figura 13A). Os níveis de cloro no grupo de PROLEUKIN foram também reduzidos para menos de 95 MEQ/L com início no dia 3 e permaneceram baixos até ao dia 15 (Figura 13B). O nível de cálcio foi mais baixo em dois dos três animais de PROLEUKIN nos dias 6 e 8, e atingiram valores tão baixos quanto 4,9 e 3,1 mg/dL no animal A199 (Figura 13C). O nível de potássio diminuiu para menos de 3 MEQ/L do dia 3 ao 12 em todos os animais tratados com PROLEUKIN excepto o animal A199 cujo nível de potássio na verdade aumentou para um nível tóxico de 7,2 MEQ/L antes de serem removidos do estudo (Figura 13D).

(f) Sinais de Derrame Vascular. O nível de albumina do soro diminuiu em ambos os grupos de PROLEUKIN (37%) e IL-2/N88R (19%) (Figura 14A). Um aumento no nível de hematócrito foi observado no grupo de PROLEUKIN nos dias 3 e 6 (Figura 14B). Em contraste, os níveis de hematócrito tanto no grupo de transportador de

controle como no grupo de IL-2/N88R diminuíram durante o mesmo período de tempo e permaneceram baixos, indicando anemia ligeira como esperado devido a múltiplas recolhas de amostras de sangue (Figura 14B&C). O aumento do hematócrito no grupo de PROLEUKIN quando acoplado com uma diminuição em albumina é consistente com o desenvolvimento da síndrome de derrame capilar.

3. Activação Celular.

As eficiências de PROLEUKIN e de IL-2/N88R foram seguidas através da variação da percentagem de linfócitos CD25 positivos (tráfico + proliferação) e a média da fluorescência para CD25 ou um número de antígenos de CD25 expressa na superfície de uma dada célula T (CD25 = IL-2R de afinidade baixa). A expressão de CD25 foi seguida na população total de células T (células CD3+) assim como as populações CD3+CD4+ e CD3+CD8+.

A actividade de IL-2 em células "Natural Killer" (NK) foi seguida através de uma análise do tráfico de células CD3-CD16+ e CD3-CD25+CD16+ NK. Os números absolutos de células CD3+, CD4+, CD8+, NK foram determinados multiplicando a percentagem de células pelo número de linfócitos por mm³, resultados obtidos durante a análise de hematologia.

(a) Regulação da expressão de CD25 na superfície de células T. A percentagem de células T activadas, como indicado por células CD25 positivas, foi regulada positivamente pelo dia 6 do estudo, principalmente na subpopulação de células T CD3+CD4+. A PROLEUKIN parece induzir a expressão de CD25 numa percentagem mais elevada de subpopulações de células T CD3+, CD3+CD4+ e CD3+CD8+ totais, no dia 6. Todavia, pelo dia 8 a percentagem de

células expressando o antígeno CD25 foi idêntica nos linfócitos de chimpanzés tratados por PROLEUKIN e dos chimpanzés tratados com IL-2/N88R (Figura 15A, B e C). Não foi observada coloração para CD25 na superfície da população de células *Natural Killer* (NK) nem em chimpanzés tratados com PROLEUKIN nem com IL-2/N88R. Suspeita-se que a falta de expressão de IL-2R α (o antígeno constituído alvo para a coloração da superfície de células por CD25) na superfície da população de células NK (CD3-/CD16+) seja responsável por estes resultados.

O número absoluto de células T CD3+CD25+ seguiu um padrão semelhante à percentagem de células T CD3+CD25+, com a PROLEUKIN a parecer mais activa do que IL2/N88R (Fig. 16A). IL-2/N88R exibiu um potencial de activação de células T semelhante à PROLEUKIN na população de células T CD3+CD4+, como a regulação positiva do número absoluto de linfócitos CD3+CD4+CD25+ induzidos por IL-2/N88R foi idêntica à regulação positiva observada com PROLEUKIN (Fig. 16B). PROLEUKIN pareceu aumentar o número de células T CD3+CD8+CD25+ numa extensão maior do que IL-2/N88R (Fig. 16C).

O número de moléculas de CD25 (média de fluorescência) expressa na subpopulação de células T CD3+CD4+ T seguiu cinética idêntica quer com tratamento de PROLEUKIN ou IL-2/N88R (Fig. 17).

(b) Tráfico de linfócitos: efeito de tratamento com PROLEUKIN e IL-2/N88R. As actividades de PROLEUKIN e IL-2/N88R nas populações de células T e NK foram determinadas através da análise da variação no número absoluto de linfócitos em circulação antes, durante e após o tratamento (Fig. 18). IL-2/N88R pareceu possuir uma actividade superior a PROLEUKIN

para aumentar o número absoluto de linfócitos CD3+CD4+ em circulação (Fig. 18A), e uma actividade levemente reduzida comparada com PROLEUKIN para aumentar o número absoluto de linfócitos CD3+CD8+ em circulação (Fig. 18B). Ambos os compostos possuíam um efeito comparável, embora modesto, no aumento do número total de linfócitos CD3+ (Fig. 18C). Nem PROLEUKIN nem IL-2/N88R afectaram o tráfico de células NK (Fig. 18D).

C. Conclusão

IL-2/N88R foi gerado através de um rastreio de proteínas de IL-2 mutante em ensaio de células T e NK humanas primárias. Exibiu selectividade *in vitro* para células T em relação a células NK de ~6000 vezes. Com base neste perfil celular, foi postulado que iria induzir apenas efeitos colaterais suaves quando administrado numa dose que iria produzir activação de células T significativa. Experiências em chimpanzé, comparando PROLEUKIN com IL-2/N88R, confirmaram que IL2/N88R possui um perfil de segurança significativamente melhor do que PROLEUKIN, embora retendo capacidade comparável para induzir a activação de células T.

Exemplo 8: Eficiência de N88R agonista selectivo para IL-2 no modelo de tumor com metástases do pulmão CT-26.

Protocolo: Foram injectados intravenosamente (IV) murganhos (Balb/c, fêmeas, 6-8 semanas de idade) com 1×10^5 células CT-26 (carcinoma do cólon de murídeo) em 0,2 mL de PBS na veia da cauda lateral no dia 0. O tratamento foi com PROLEUKIN ou IL-2/N88R em doses diferentes (diluente: dextrose a 5% em água

(D5W)), ou D5W, distribuído IV, uma vez por dia durante 8 dias (QD x 8) começando no dia 1, após-implantação. Foi preparado IL-2/N88R à temperatura ambiente por diluição em D5W utilizando frascos siliconizados utilizando uma seringa de tuberculina e doseados para animais dentro de 2 horas de preparação. Foi preparada PROLEUKIN adicionando 0,7 mL de água estéril para injeção (SWFI) a cada frasco (concentração final, 1,86 mg/mL). Foram realizadas diluições como descrito para IL-2/N88R em D5W (Tabela 6). Os animais foram sacrificados no dia 11. Os pulmões foram removidos e pesados, lavados em PBS, e o tecido foi transferido para solução de Bouin. O tecido foi transferido 24 horas mais tarde para formalina a 10%. O número de colônias metastáticas nos pulmões foi contado num microscópio de dissecação.

Tabela 6. Dose e grupos num estudo em modelo de tumor CT-26 de murídeo

Grupos	n	Tratamento	Dose, mg/kg
1	14	D5W	NA
2	11	PROLEUKIN	3 mg/kg
3	11	PROLEUKIN	10 mg/kg
4	11	IL-2/N88R	1 mg/kg
5	12	IL-2/N88R	3 mg/kg
6	12	IL-2/N88R	10 mg/kg
7	12	IL-2/N88R	30 mg/kg
8	11	IL-2/N88R	60 mg/kg

A Tabela 7 apresenta o número de metástases contadas em murganhos individuais. A eficiência comparativa foi observada tanto para IL-2/N88R como PROLEUKIN. A uma dose elevada de IL2/N88R (grupo 8, 60 mg/kg), todos menos um murganho tiveram 12 metástases ou menos; 3 dos murganhos não exibiram metástases. Isto está em contraste com a dose mais elevada de PROLEUKIN testada, em que todos os murganhos sobreviventes tinham 12 metástases ou mais.

Tabela 7. São listadas contagens e médias de metástases individuais.

Grupo	Metástases de pulmão (são listadas as contagens para murganhos individuais)	Média	SEM	Valor de P (2 caudas)
1	0 129 183 179 155 165 200 152 148 158 200 194 165 125	154	13,42	
2	118 126 107 111 118 110 137 114 135 158 132	124	4,61	0,07278
3	12 38 18 19 30	23	4,66	0,00003
4	169 173 189 200 120 117 136 122 200 163 110	154	10,41	0,97029
5	171 176 186 159 192 139 117 200 195 116 192	168	9,31	0,43401
6	92 111 112 114 109 84 68 47 58 49 112	87	8,16	0,00060
7	15 13 59 62 23 55 46 16 9 4 8 2	26	6,57	0,00000
8	7 0 3 2 4 9 7 0 12 55 0	9	4,75	0,00000

Foi observada redução significativa ($P < 0,05$) nas metástases em murganhos tratados com IL2/N88R a doses de 10, 30, e 60 mg/kg (grupos 6, 7, e 8, respectivamente), e no grupo tratado com 10 mg/kg de PROLEUKIN (grupo 3). Estes resultados são apresentados graficamente na Fig. 19. Os resultados são representados utilizando o log da dose: para PROLEUKIN, as doses foram de 3 e 10 mg/kg; para IL-2/N88R, as doses foram de 1, 3, 10, 30, e 60 mg/kg. O ajuste de curva utilizando uma equação não

linear (ajuste de 4 parâmetros) produziu valores de IC_{50} de 5,2 mg/kg para PROLEUKIN, e 10,9 mg/kg para IL-2/N88R.

A partir dos resultados nesta experiência, a IC_{50} em relação à redução no número de metástases para IL-2/N88R foi calculada como sendo 10,9 mg/kg (8,6-13,9 mg/kg a 95% de confiança), e para PROLEUKIN como sendo 5,2 mg/kg (3,5-7,7 mg/kg a 95% de confiança).

As sobrevivências dos murganhos são apresentadas na Tabela 8. No grupo de 10 mg/kg de PROLEUKIN, um (1) murganho morreu no dia 7, e mais cinco (5) morreram no dia 8. Um (1) murganho morreu no dia 8 em cada um dos grupos tratados com 3 ou 10 mg/kg de IL-2/N88R, e não foram observadas mortes em qualquer de 1, 30 ou 60 mg/kg de IL-2/N88R. Adicionalmente, a maioria dos murganhos tratados com 3 mg/kg de PROLEUKIN e todos os murganhos tratados com 10 mg/kg de PROLEUKIN ficaram moribundos; não foi observada morbidez em murganhos tratados com IL-2/N88R.

Tabela 8. Sobrevivência de murganhos tratados com IL-2/N88R ou PROLEUKIN

Grupo	Dia			
	0	7 ⁴	8	11
D5W ¹	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Pro:3 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Pro:10 mg/kg ²	100,0%	90,9%	45,5%	45,5%
IL-2/N88R:1 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
IL-2/N88R:3 mg/kg ²	100,0%	100,0%	91,7%	91,7%
IL-2/N88R:10 mg/kg ²	100,0%	100,0%	91,7%	91,7%
IL-2/N88R:30 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
IL-2/N88R:60 mg/kg ²	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

¹n=14 murganhos/grupo

²n=11 murganhos/grupo

³n=12 murganhos/grupo

⁴Não se observaram mortes antes do dia 7.

Animais tratados com PROLEUKIN em ambos os grupos ficaram moribundos. Não se observou morbidez em qualquer um dos animais tratados com IL-2/N88R.

Em resumo, estes estudos indicam que IL-2/N88R é tão eficaz como PROLEUKIN a reduzir a carga tumoral (conforme medido por contagem de metástases de pulmão no modelo de CT26). Adicionalmente, IL-2/N88R demonstrou ser substancialmente menos tóxico do que PROLEUKIN.

Exemplo 9. Desenvolvimento de linhas de células CHO estáveis, de produção elevada que expressam IL2N88R.

Linhas celulares de produção estável que secretam quantidades elevadas da muteína IL2N888R foram desenvolvidas transfectando células CHO (dhfr-) com um vector de expressão apresentado na Figura 20. Os elementos individuais do vector de expressão de IL2N88R são apresentados no mapa plasmídico (Fig. 20). Apresenta CMVe/p = promotor precoce de Citomegalovírus; PA = sequência sinal de poliadenilação de SV40; e DHFR = cassete de expressão da redutase de di-hidrofolato.

O vector foi construído utilizando técnicas de ADN recombinante convencionais. Ver, de um modo geral, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2^a ed., 1989, Cold Spring Harbor Press; Short Protocols in Molecular Biology, 2^a ed., 1992, John Wiley & Son; Methods in Enzymology vol. 185, Ed. Goeddel *et al.*, Academic Press, Inc., Londres, 1991. O vector de expressão contém cassetes de expressão discretas para o gene IL2N88R e o gene DHFR amplificável e seleccionável (redutase de di-hidrofolato). Cerca de 1×10^6 células CHO (ovário de hamster Chinês) foram transfectadas com 10 µg de pBC1IL2SA utilizando reagentes de Lipofectina (Life Technology Inc., Bethesda, Maryland) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então seleccionadas na presença de metotrexato a 50 nM e cultivadas em meio DME/F12 (Life Technologies, Inc.) deficiente em timidina e hipoxantina mais soro de bovino fetal a 5% dialisado. As populações celulares foram rastreadas para a produção de IL2N88R com um kit de ELISA comercial (R & D Systems). As populações de produção elevada foram ainda seleccionadas em meios contendo concentrações crescentes de metotrexato (metotrexato a 100 a 400 nM) e rastreadas para a

produção de IL2N88R. Foi então aplicada clonagem de diluição limitante para derivar clones com produtividade elevada e estável. A clonagem foi realizada na ausência de metotrexato utilizando técnicas de cultura de tecidos convencionais.

Exemplo 10. Produção de IL2N88R isenta de soro num biorreactor de perfusão.

Foi realizada produção contínua de IL2N88R por fermentação de perfusão contínua. Foi inoculado um fermentador Wheaton de 19 litros com a linha de células CHO estáveis do Exemplo 9 a 2×10^6 células/mL e submetidas a perfusão a uma taxa de substituição de meio de 5 litros/dia. O meio de produção foi um meio à base de DME/F12 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) suplementado com insulina humana recombinante (10 µg/mL) (HUMULINTM, Eli Lilly, Inc., Indianapolis, IN) e FeSO₄.EDTA (50 µM). A densidade celular foi mantida a 4×10^6 células/mL. O rendimento diário médio do fermentador foi de ~200 mg/dia. A produção de IL2N88R foi mantida estável durante 30 dias.

Exemplo 11. Purificação de IL-2/N88R produzido em células CHO.

O processo seguinte foi aplicado ao eluato de perfusão acima descrito. O meio de perfusão foi recolhido e aplicado a uma coluna de S-sepharose. A coluna foi equilibrada com Tampão fosfato a 20 milimolar com NaCl a 5 milimolar a pH 7,0. O alimentador ("TCF") é ajustado para condutividade de 4 milisiemens com a adição de água e ajustado para o mesmo pH, com ácido fosfórico.

Após o TCF ser aplicado a coluna é lavada no mesmo tampão de equilíbrio. A eluição é realizada através de um desvio de pH. As mteínas foram eluídas com etanolamina a 20 mM, pH 10,5, para remover as mteínas da coluna por lavagem para produzir o S-eluito.

A permuta aniônica foi realizada passando o S eluito por uma coluna de QAE Fast FlowTM (Pharmacia) equilibrada com 10 mM de tampão Bicarbonato a pH 10,5. A taxa de fluxo foi mantida a 250 cm/h. Após lavagem para a linha de base a IL-2SA foi eluída com fosfato a 20 mM pH 4,0.

A cromatografia em hidroxiapatite (HAP) foi realizada passando o eluito de QAE diluído (1:1 com WFI) através de uma coluna empacotada com hidroxiapatite cerâmico (Tipo II, Bio-Rad, Hercules, CA) equilibrada com Fosfato a 0,1 mM a pH 7,0. A taxa de fluxo foi mantida a 250 cm h⁻¹. Após lavagem até à linha de base a IL2SA foi eluída com Fosfato a 100 mM a pH 7,0.

O eluito de hidroxiapatite foi ultrafiltrado para 300 mL de volume com uma unidade de Pelicon-2 Millipore adaptada com três cartuchos PES 5K (Millipore Corporation, Bedford, MA).

O eluito ultrafiltrado HAP foi ainda purificado por passagem através de uma coluna de exclusão de tamanho S100HR (Pharmacia) a 35 cm/h. A coluna foi equilibrada com Fosfato a 10 mM e NaCl a 150 mM pH 7,0.

A mistura de Filtração em Gel foi diluída com WFI para realizar uma condutividade de 4,0 mMhos/cm e foi reaplicada a

S-Sepharose nas condições previamente descrita. A IL2SA foi eluída com tampão Fosfato a 10 mM com NaCl a 1 Molar a pH 7,0.

A mistura de permuta catiónica final foi dialisada contra Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) durante a noite e o diluído com PBS estéril para uma concentração de 6 mgs/mL. A mistura final diluída foi então esterilizada por filtração, dividida em fracções e depois congelada a -70 °C. A recuperação total foi de 65%.

Outras formas de realização da invenção serão aparentes para um especialista na técnica. Esta invenção ensina como obter muteínas não descritas aqui especificamente mas que provocam activação de células T como evidenciado por proliferação de blastos de PHA, e proliferação reduzida de células NK, e deste modo essas muteínas estão dentro do espírito e âmbito da invenção. O conceito e abordagem experimental aqui descritos devem ser aplicáveis a outras citocinas utilizando sistemas de receptor multimérico heterólogos, em particular citocinas relacionadas IL-7, IL-9 e IL-15, IL-10, interferão α , e interferão γ .

SEQUÊNCIAS

As sequências seguintes estão contidas nesta aplicação:

SEQ ID N°: 1: hIL-2 (aminoácido)

SEQ ID N°: 2: hIL-2 (ADNc)

SEQ ID N°: 3: Iniciador de PCR 5', IL-2

SEQ ID N°: 4: Iniciador de PCR 3', IL-2

SEQ ID N°: 5: Iniciador de Mutagénese para o vector de expressão de IL-2

SEQ ID N°: 6: Iniciador de Mutagénese para mutações D20X

SEQ ID N°: 7: Iniciador de Mutagénese para mutações N88X

SEQ ID N°: 8: Iniciador de Mutagénese para mutações Q126X

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Shanafelt, Armen B.
Greve, Jeffrey M.
Jesmok, Gary
Lernbach, Kenneth J.
Wetzel, Gayle D.

<120> Agonistas e Antagonistas Selectivos para IL-2

<130> Sequência de IDS de IL-2 1-8

<140>

<141>

<150> 09/080t 080

<151> 1998-05-15

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 465

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaagtc ttgcacttgt cacaacacgt 60
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcct aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaacta 300
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa 360
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420
tggattacct tttgtcaaaag catcatctca acactgactt gataa 465

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

cctcaactcc tgaattcatg tacaggatgc 30

<210> 4

<211> 31

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ggaagoggat ccttatcaag tcagtgttga g 31

<210> 5

<211> 36

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

gcacttgtca caaacaccat ggcacctact tcaagt 36

<210> 6

<211> 28

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ggagcattta ctgotgnnt tacagatg 28

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

gggacttaat cagcnnnatac aacgtaataag

30

<210> 8

<211> 28

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 84

ggattacott ttgtannnagc atcatctc

28

Lisboa, 22 de Janeiro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Muteína de IL-2 humana numerada de acordo com a IL-2 do tipo selvagem possuindo uma substituição de aminoácidos em uma das posições 20, 88, e 126, em que

a posição 20 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir de grupo consistindo em: alanina, histidina, isoleucina, metionina, glutamina, serina, valina ou tirosina

a posição 88 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: alanina, arginina, ácido glutâmico, histidina, lisina, leucina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, serina treonina, tirosina ou valina;

a posição 126 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: asparagina, leucina, prolina fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, arginina, serina, treonina, tirosina ou valina;

e em que a referida muteína de IL-2 activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

2. Muteína de IL-2 da Reivindicação 1, em que a posição 88 é substituída com arginina.
3. Composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêutico e a muteína de IL-2 humana de qualquer das Reivindicações 1 ou 2, em que a referida composição activa

de modo preferido células T em relação às células *Natural Killer*.

4. Muteína de IL-2 numerada de acordo com a IL-2 do tipo selvagem possuindo substituições em duas das posições 20, 88 e 126, em que

a posição 20 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir de grupo consistindo em: alanina, histidina, isoleucina, metionina, glutamina, serina, valina ou tirosina

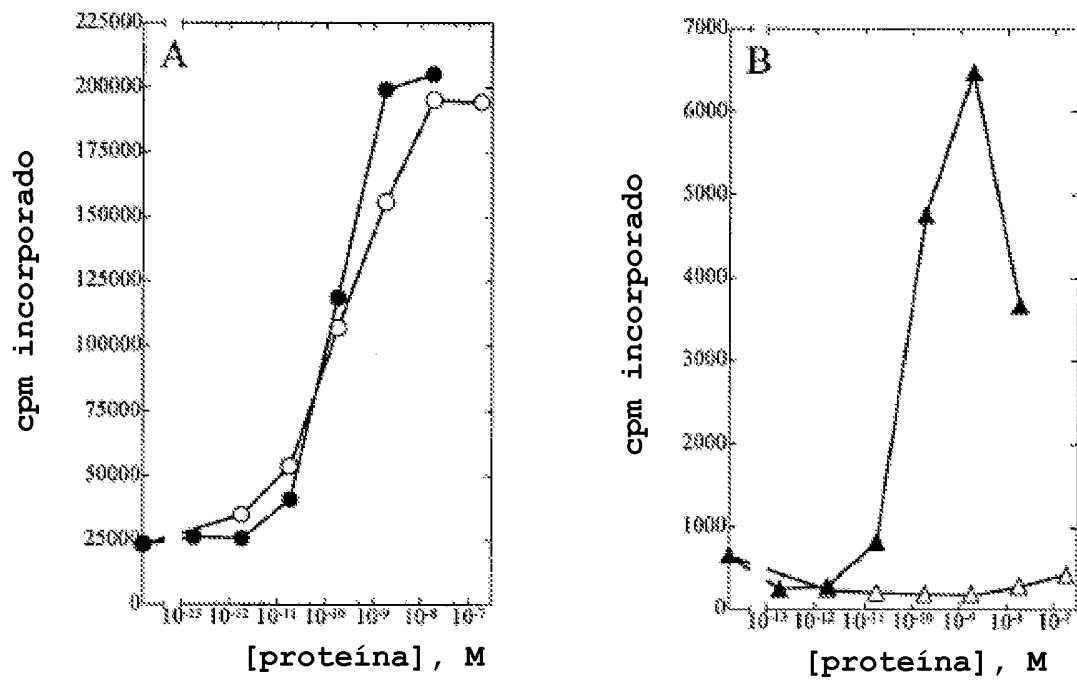
a posição 88 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: alanina, arginina, ácido glutâmico, histidina, lisina, leucina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, serina, treonina, tirosina ou valina;

a posição 126 é substituída com um aminoácido seleccionado a partir do grupo consistindo em: asparagina, leucina, prolina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, arginina, serina, treonina, tirosina ou valina; e em que a referida muteína de IL-2 activa, de um modo preferido, células T em relação às células *Natural Killer*.

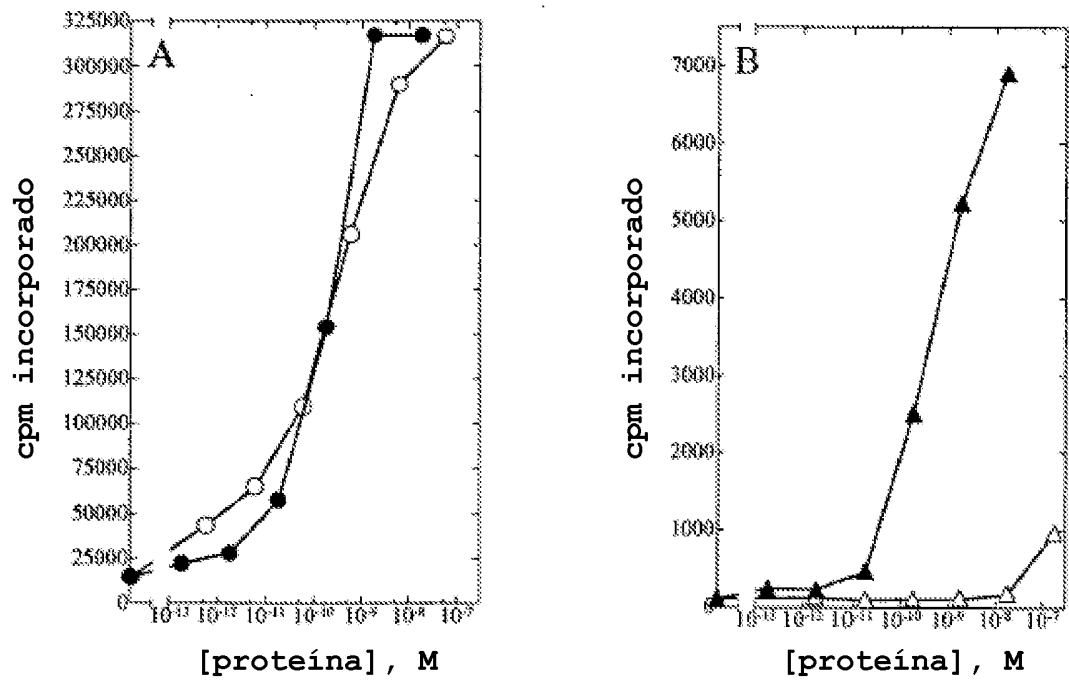
5. Polinucleótido compreendendo uma sequência de ADN que codifica a muteína de IL-2 de qualquer das Reivindicações 1, 2 e 4.
6. Vector compreendendo o polinucleótido da Reivindicação 5.
7. Célula eucariota isolada com o vector da Reivindicação 5.

8. Célula procariota transformada com o vector da Reivindicação 6.

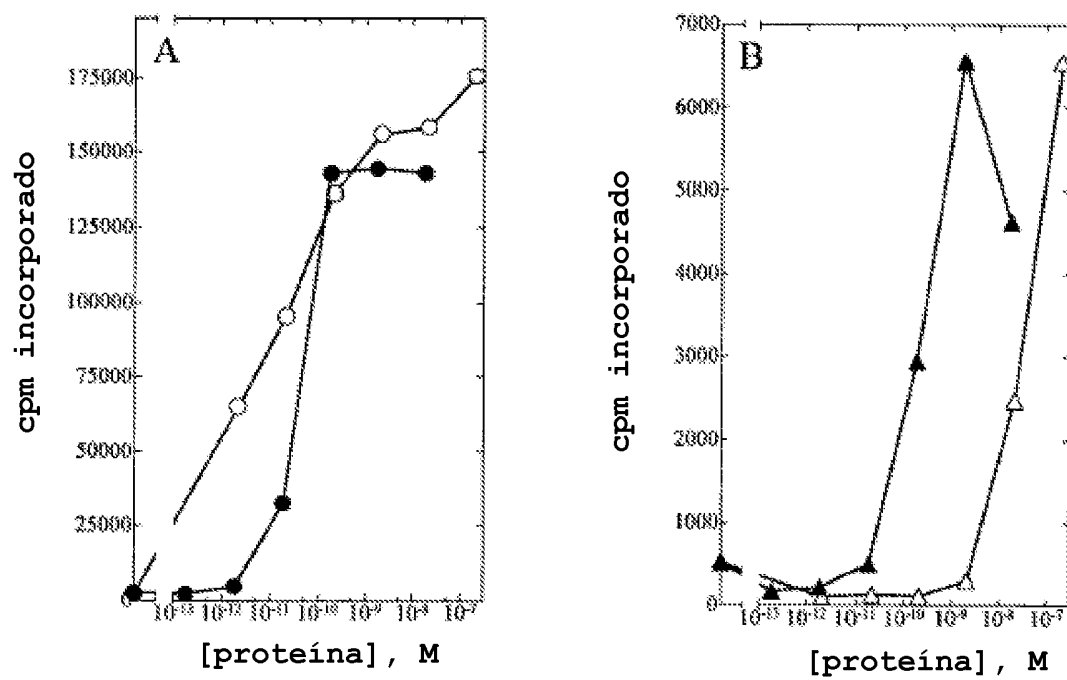
Lisboa, 22 de Janeiro de 2007



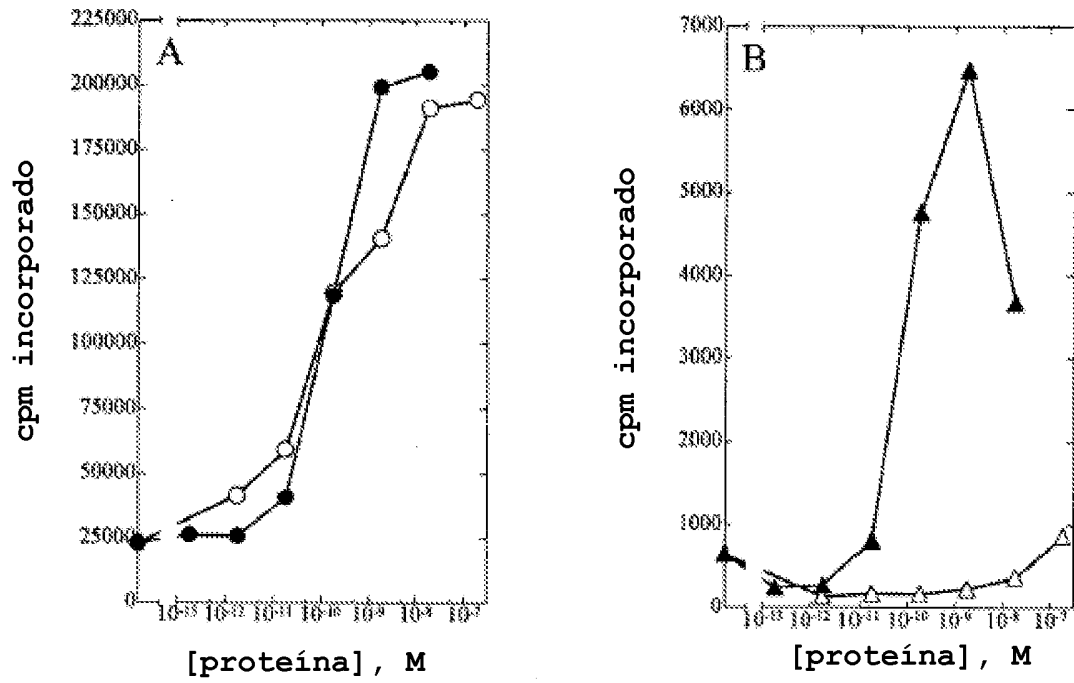
FIGURAS 1A-1B



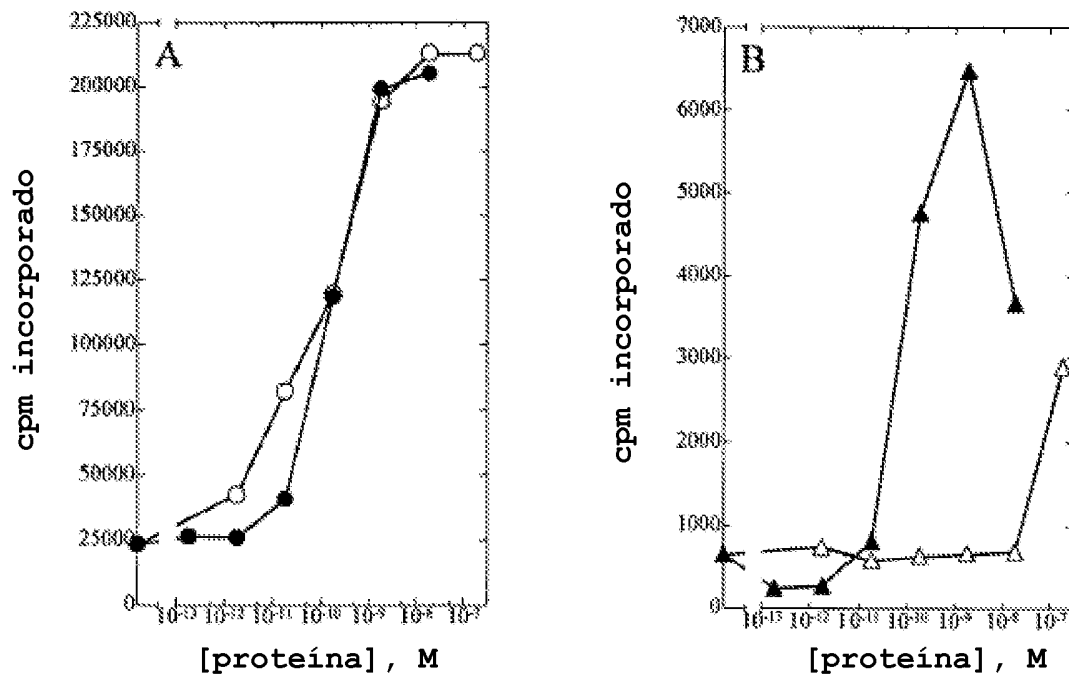
FIGURAS 2A-2B



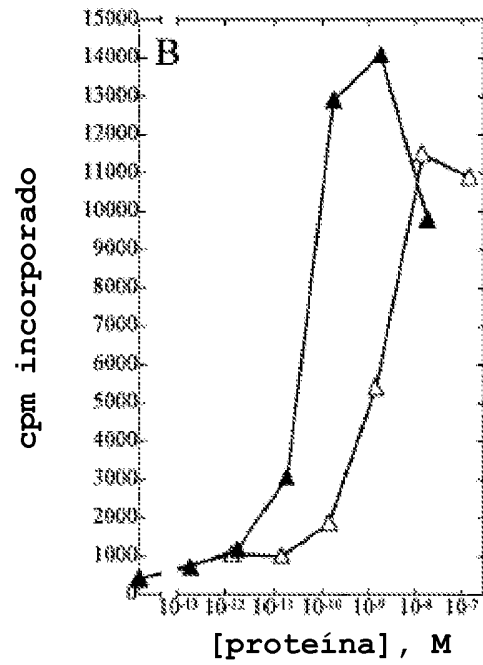
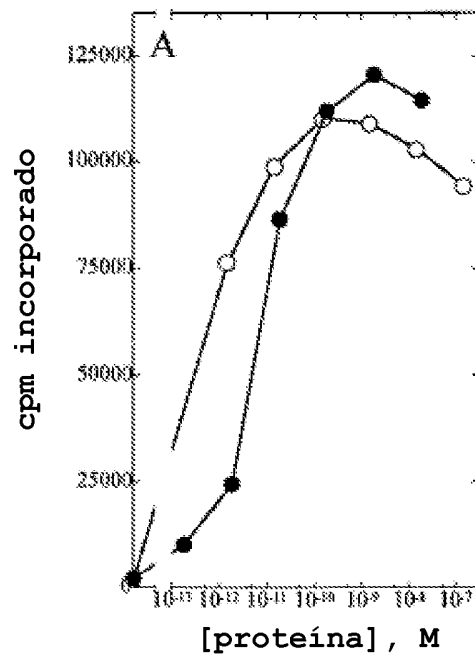
FIGURAS 3A-3B



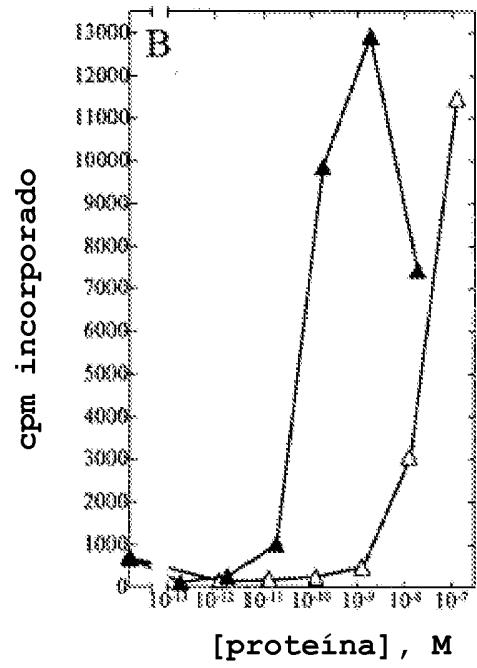
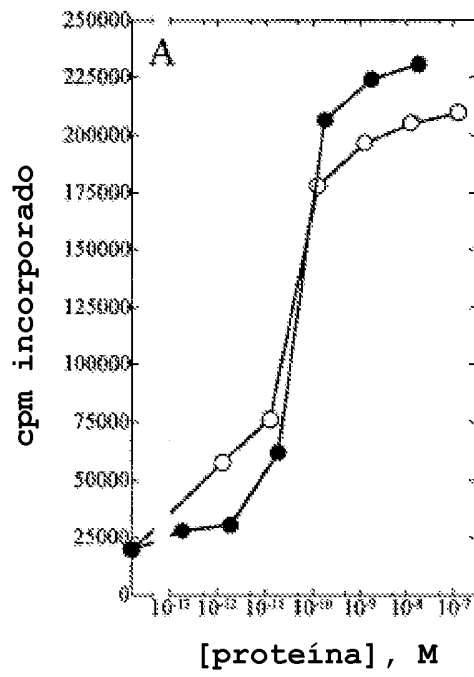
FIGURAS 4A-4B



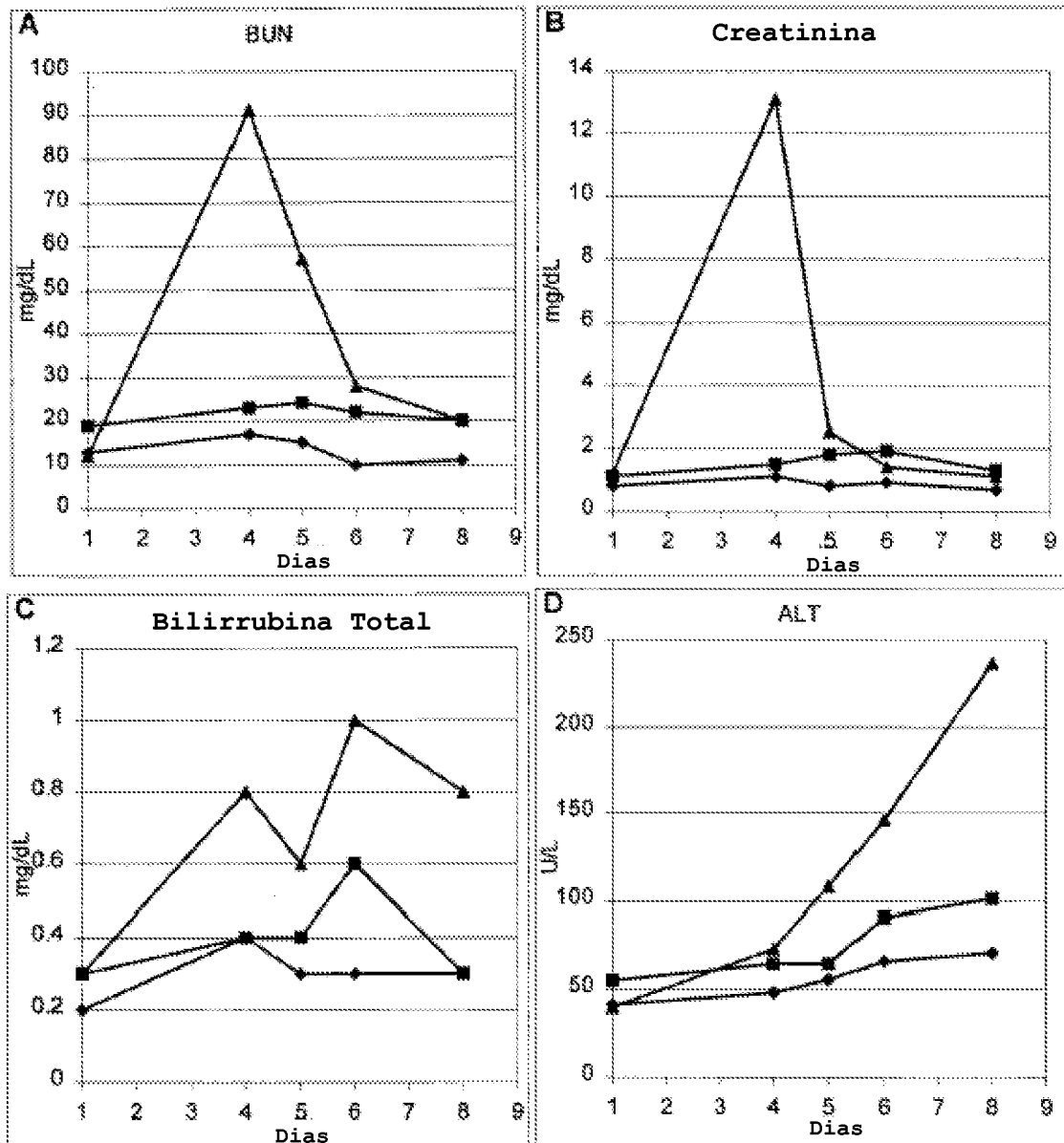
FIGURAS 5A-5B



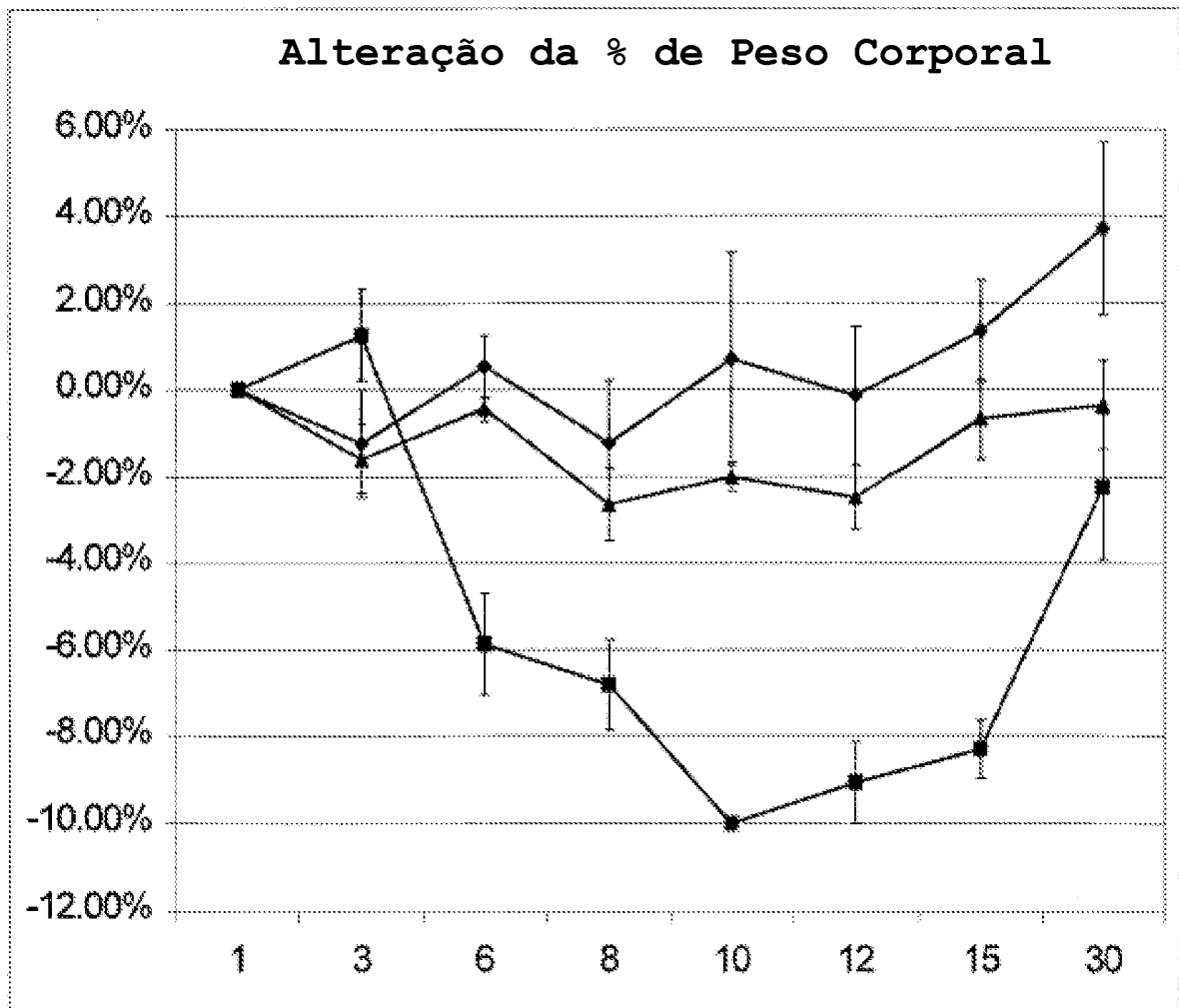
FIGURAS 6A-6B

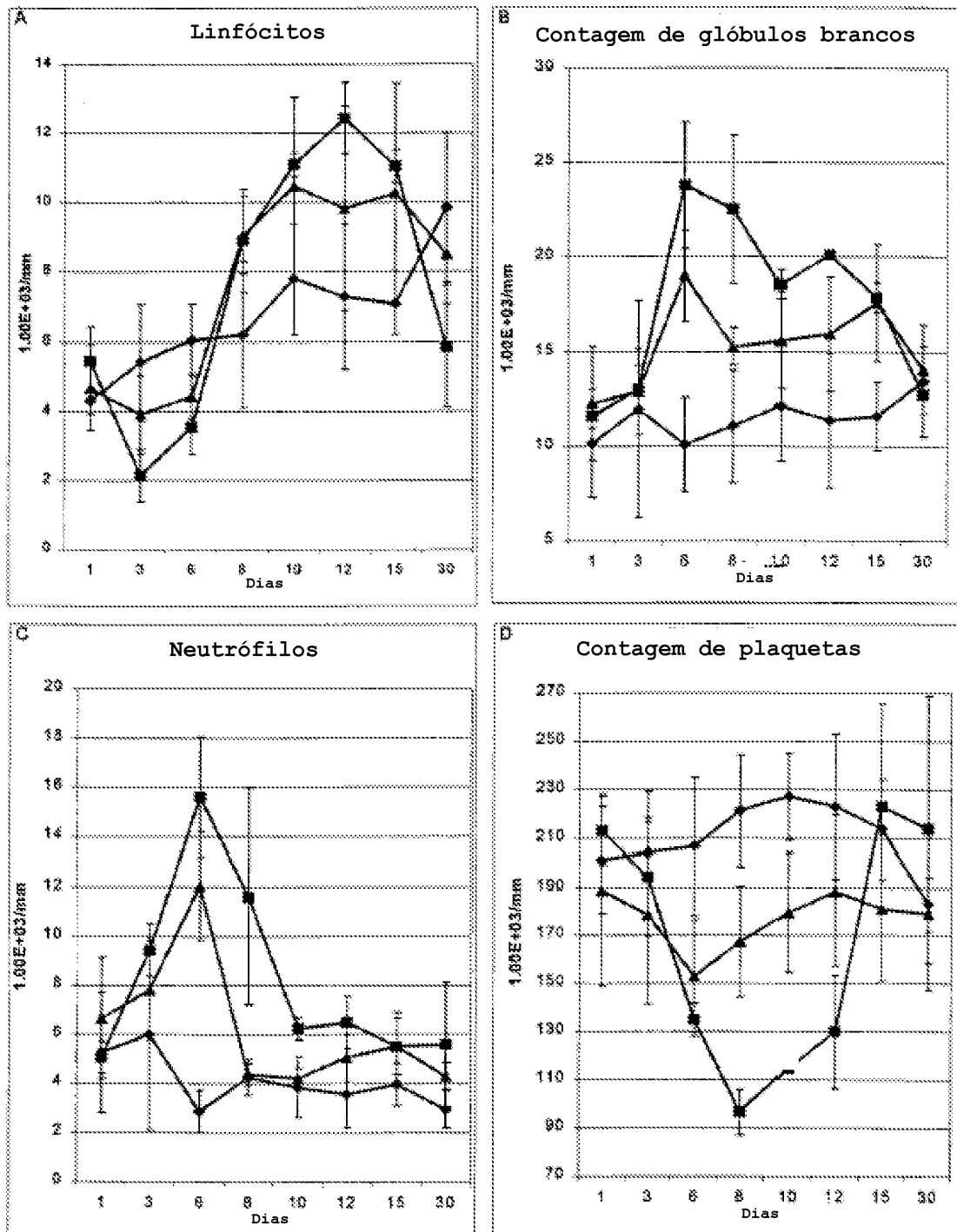


FIGURAS 7A-74B

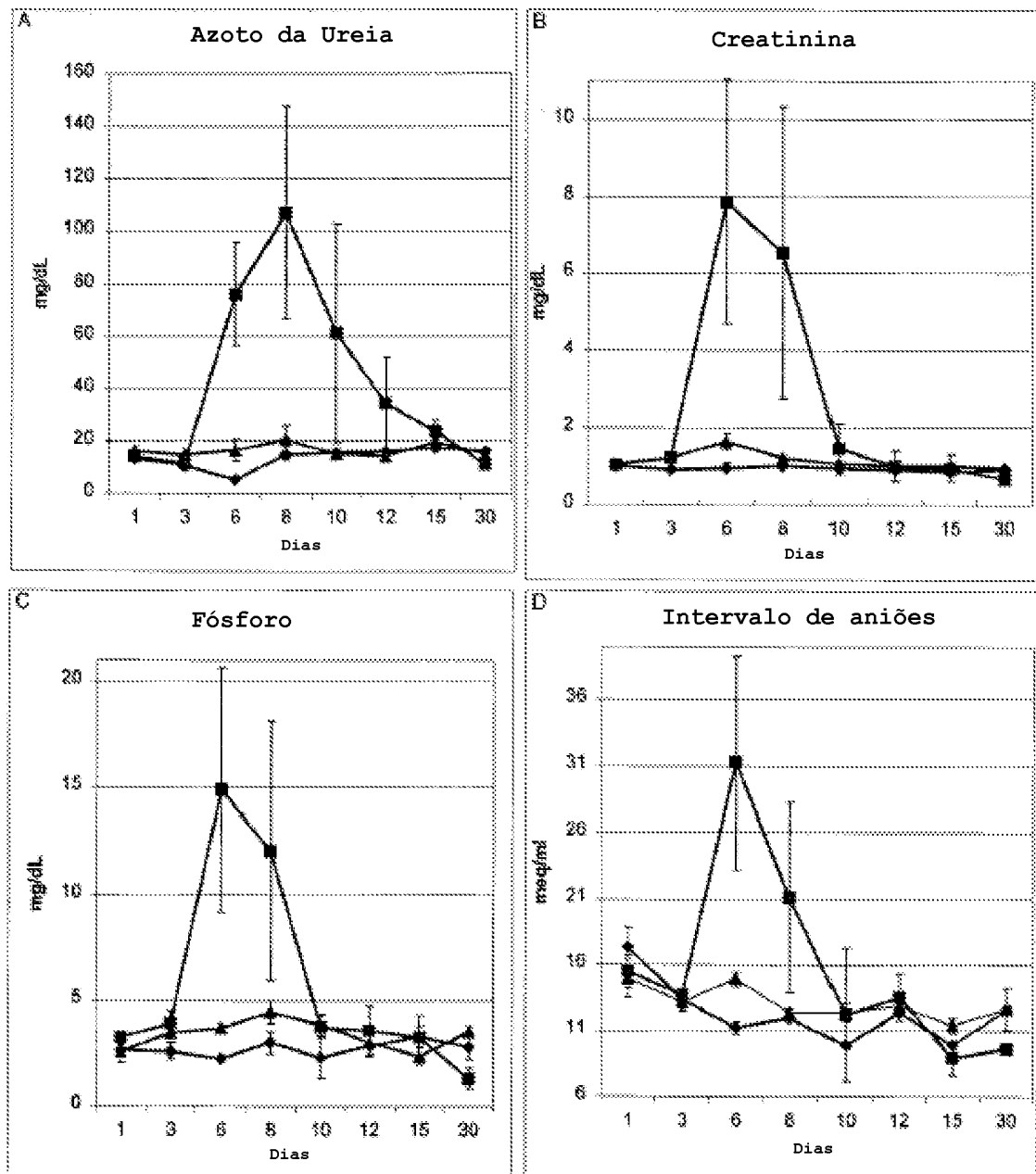


FIGURAS 8A-8D

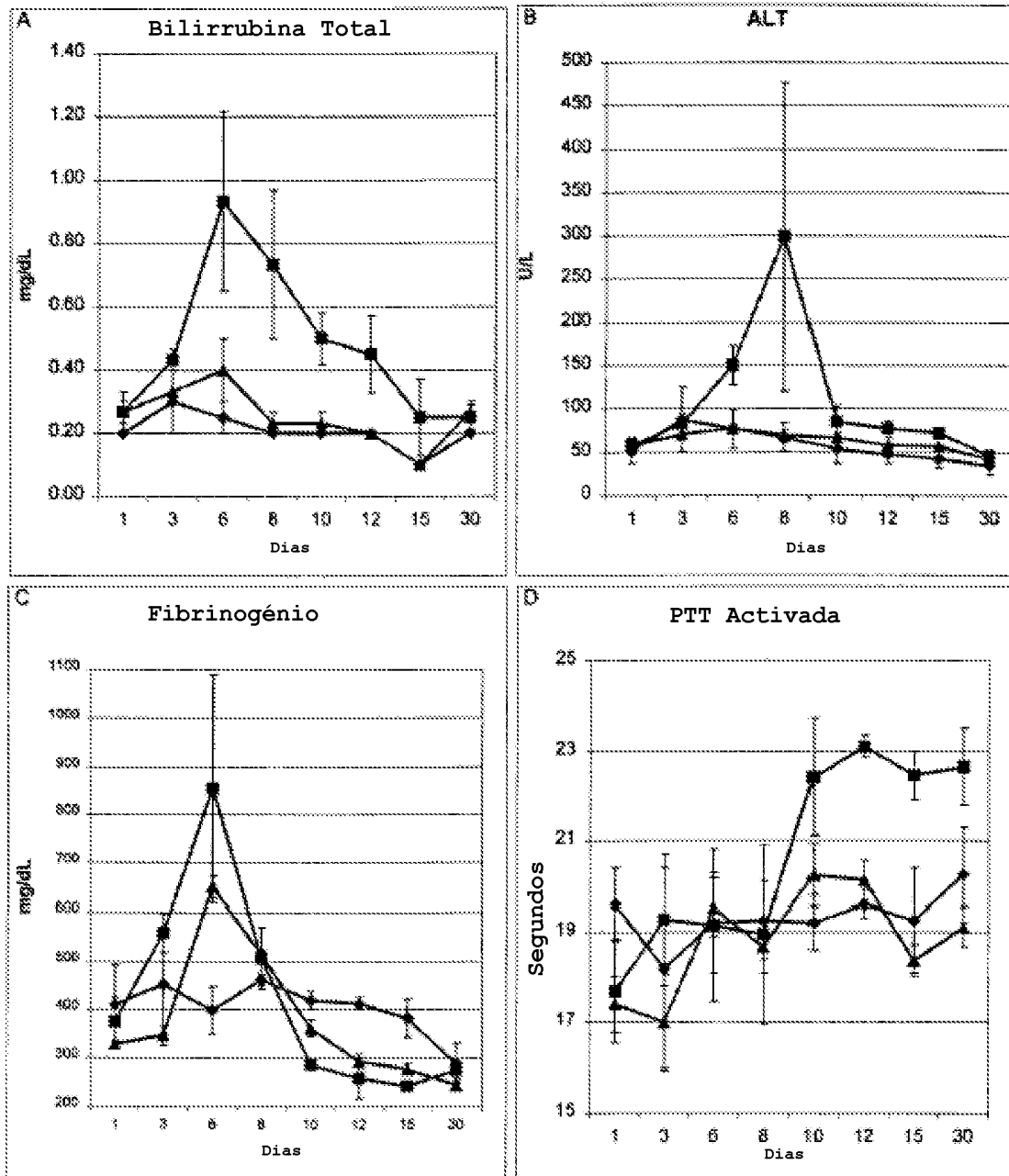
**FIGURA 9**



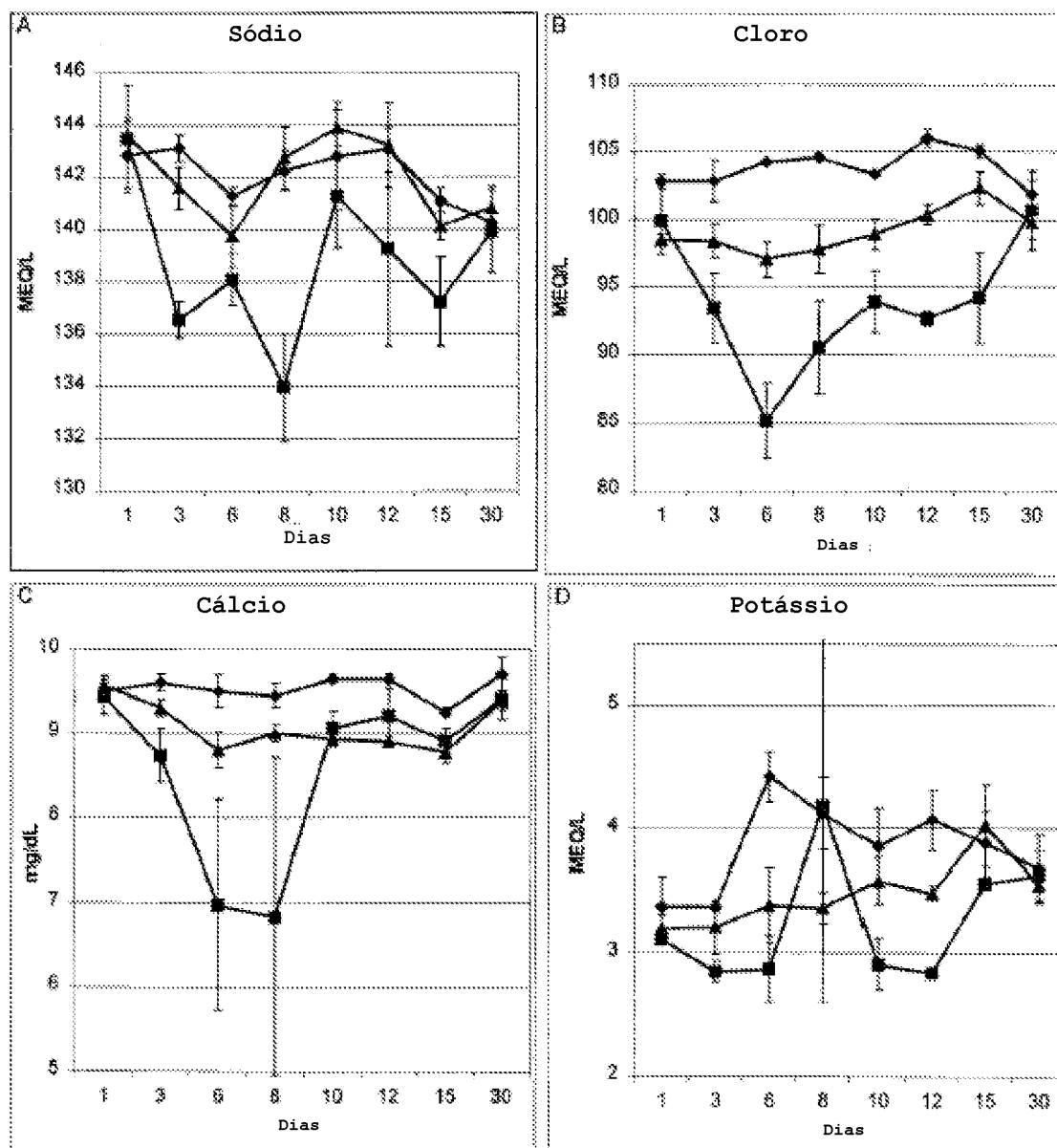
FIGURAS 10A-10B



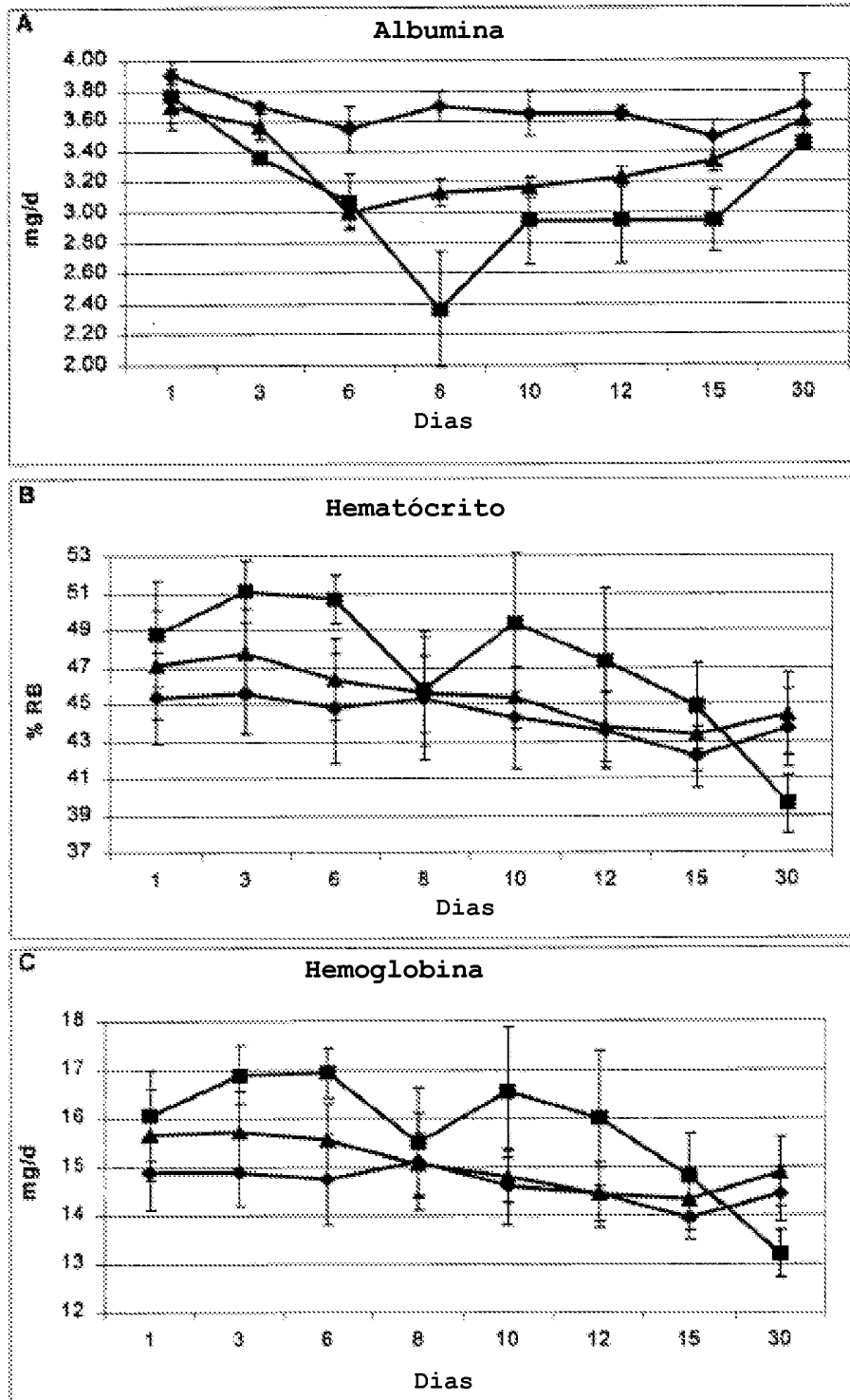
FIGURAS 11A-11D



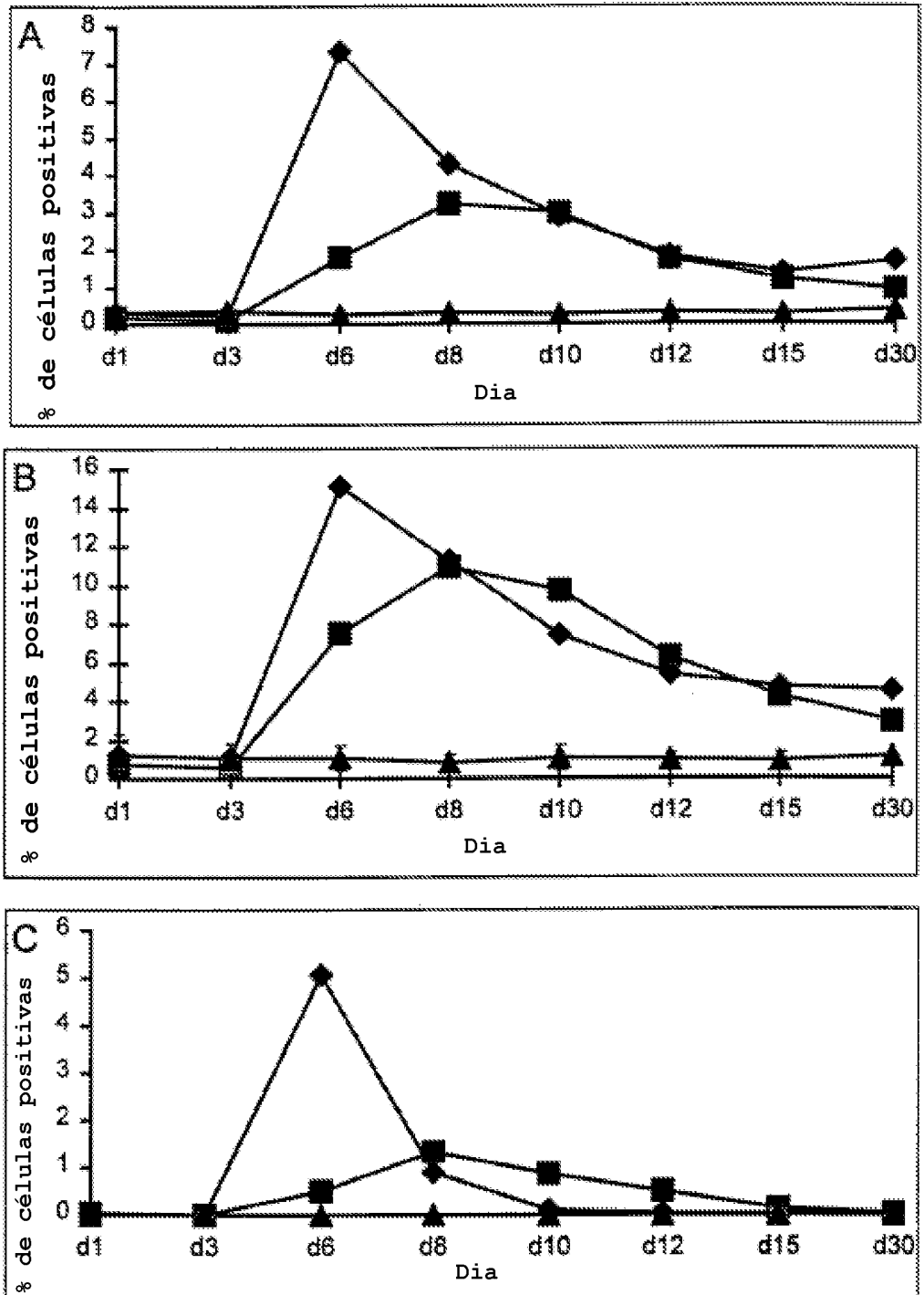
FIGURAS 12A-12D



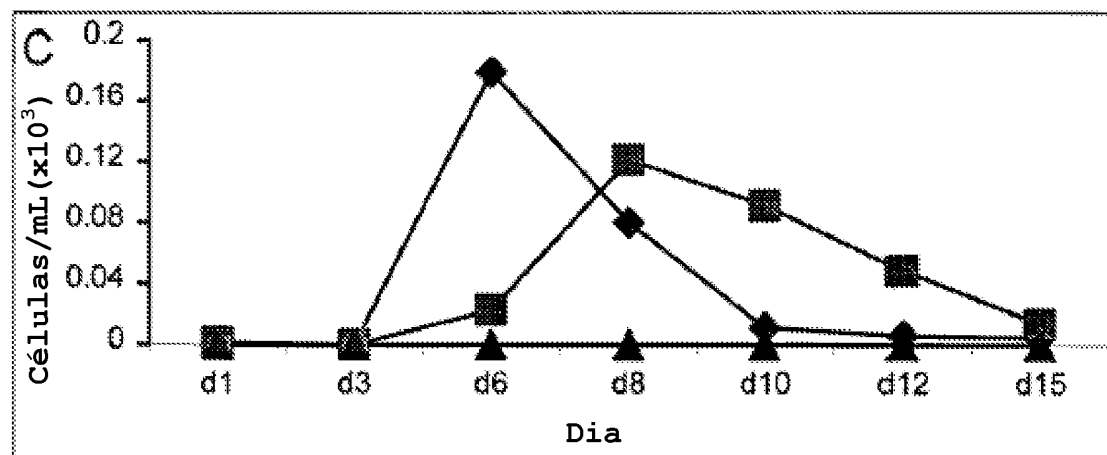
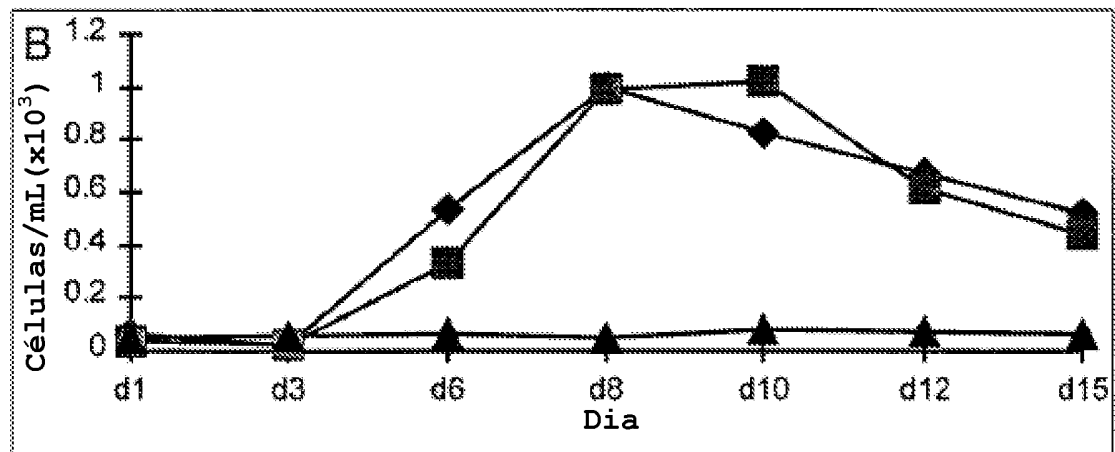
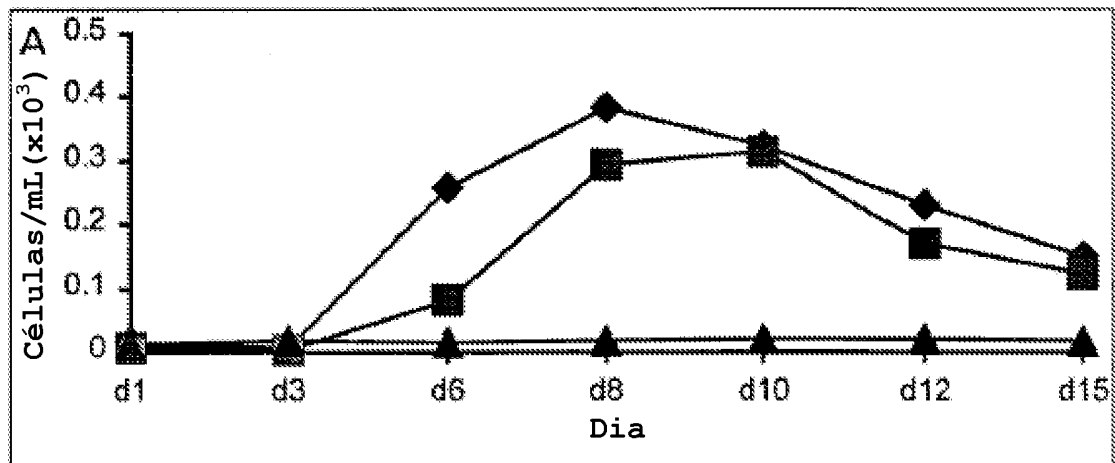
FIGURAS 13A-13D



FIGURAS 14A-14C



FIGURAS 15A-15C



FIGURAS 16A-16C

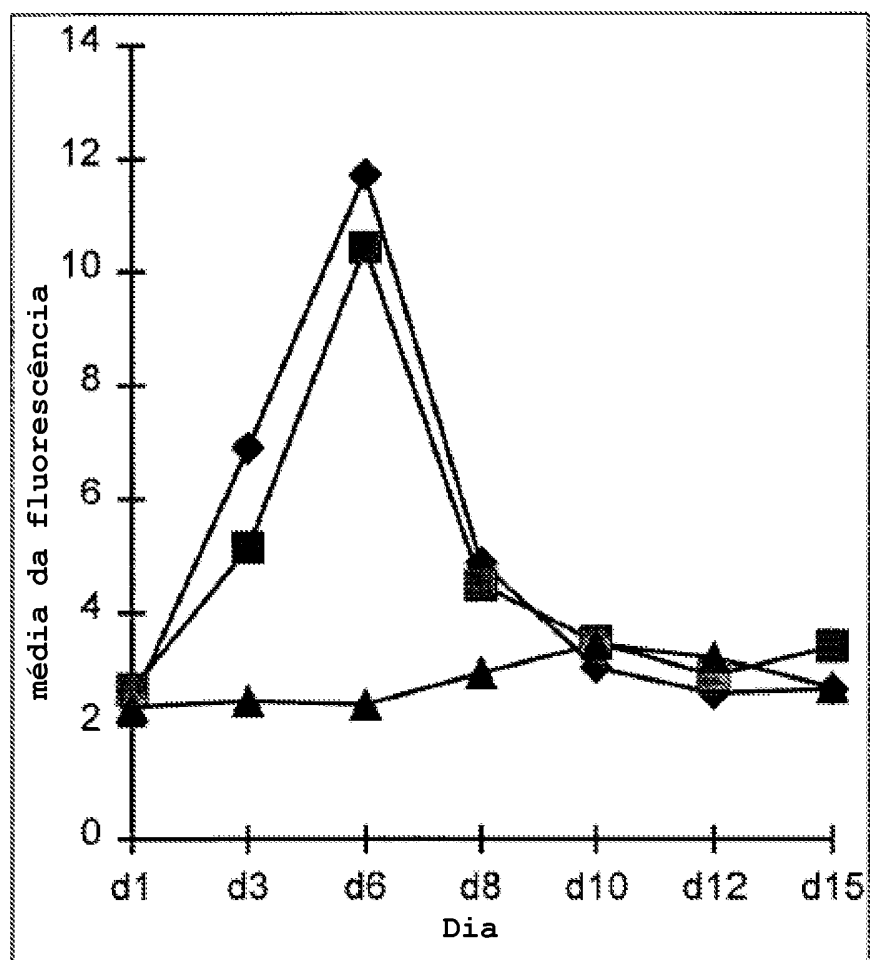
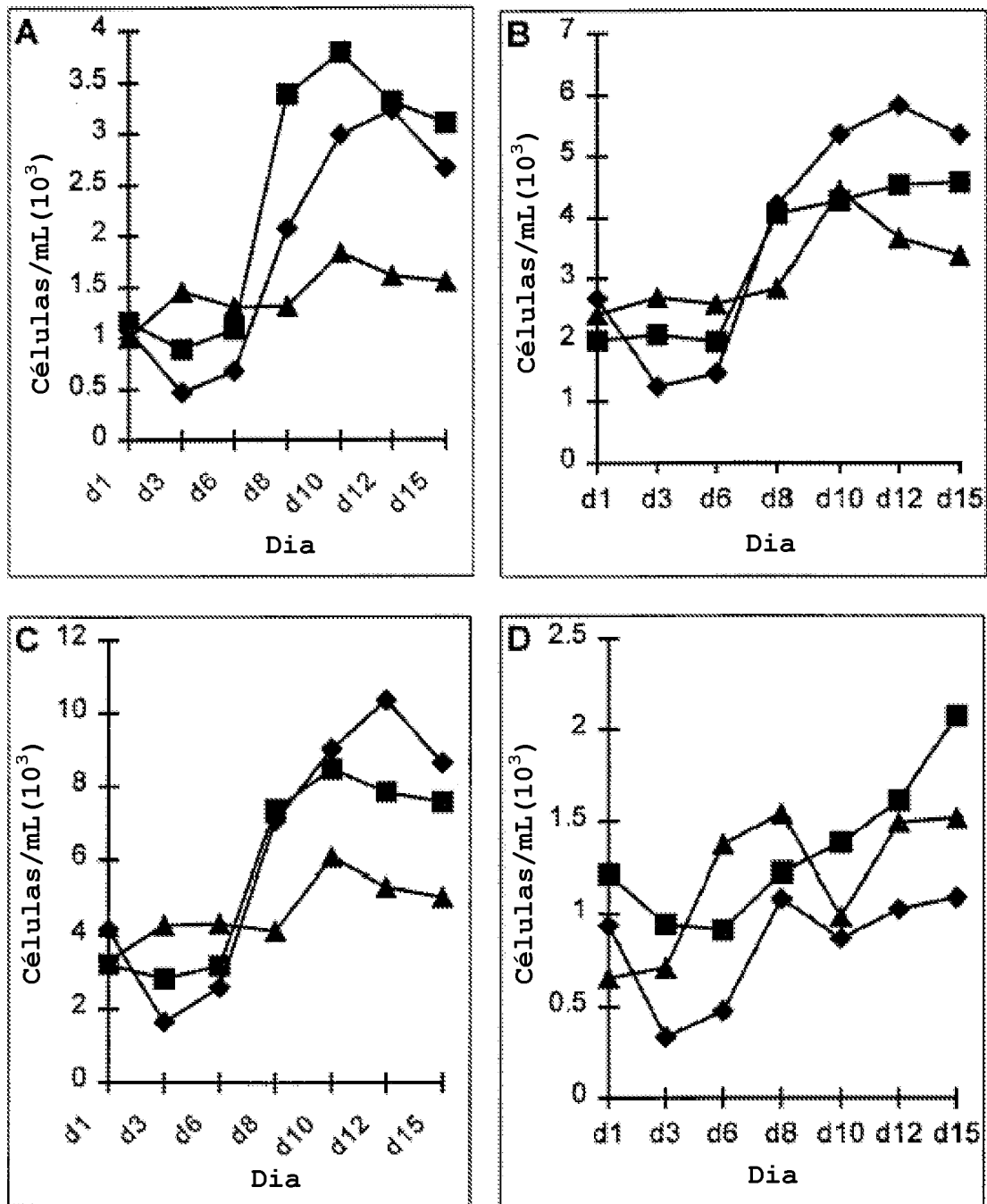


FIGURA 17



FIGURAS 18A-18D

Modelo de tumor de murídeo CT-26

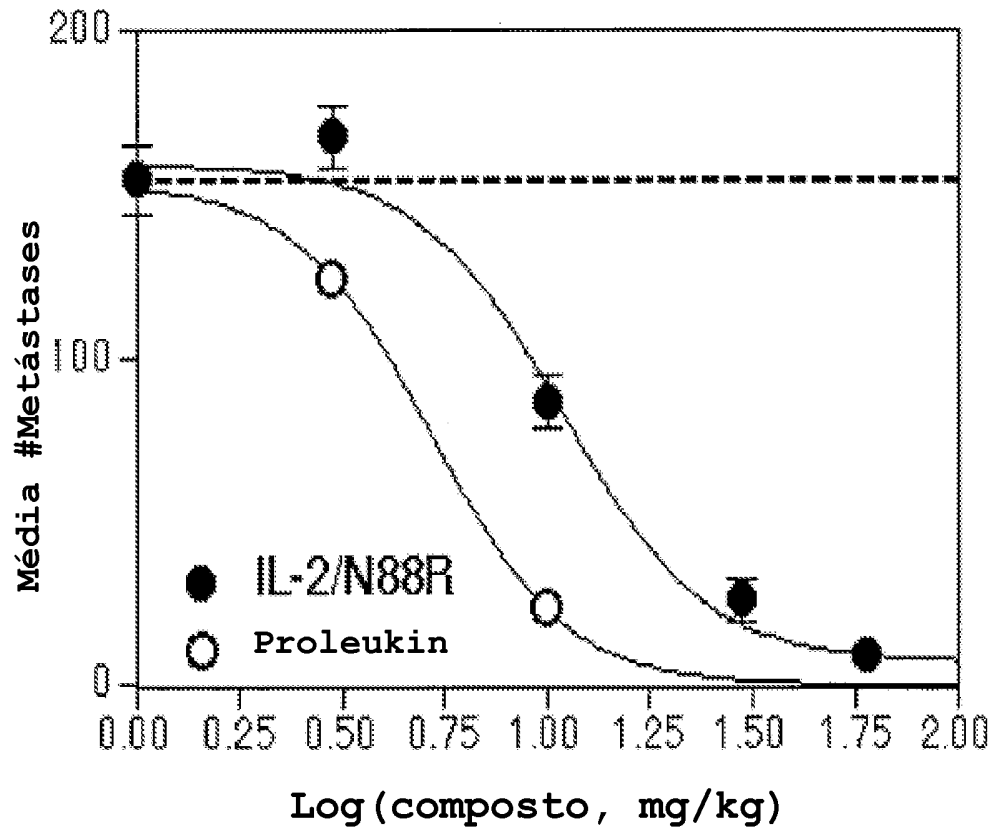


FIGURA 19

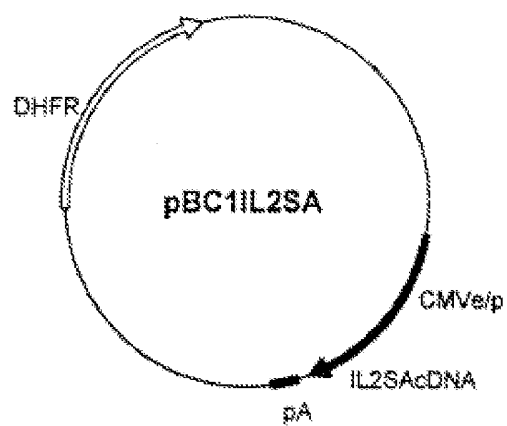


FIGURA 20