



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 886**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04804151 .1**

86 Fecha de presentación : **21.12.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1699822**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54

Título: **Proteínas de fusión de IL-7 con porciones de anticuerpo, su preparación y su empleo.**

30

Prioridad: **30.12.2003 US 533406 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73

Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72

Inventor/es: **Lauder, Scott y**
Gillies, Stephen, D.

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 305 886 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de IL-7 con porciones de anticuerpo, su preparación y su empleo.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a proteínas de fusión de interleuquina-7 (IL-7), a procedimientos para su obtención y a los empleos de las mismas. Las proteínas de fusión comprenden una porción de inmunoglobulina fusionada directamente o indirectamente con IL-7, que estaba modificada en posiciones específicas en comparación con el tipo silvestre de IL-7 con el fin de mejorar las propiedades biológicas y farmacéuticas. Las proteínas, de conformidad con la invención, son particularmente adecuadas para el tratamiento de desórdenes acompañados por inmunodeficiencias y, en particular, de enfermedades en las que estén involucradas deficiencias de las células T.

Fundamento de la invención

Diversos desórdenes y terapias están relacionados con una deficiencia de células inmunes. Por ejemplo, la infección VIH resulta de una pérdida de células CD4+ T, mientras que las terapias, tal como la quimioterapia y la terapia por radiación dan como resultado, generalmente, una pérdida de una gran variedad de células sanguíneas. Se han realizado intentos para proporcionar fármacos proteicos específicos que puedan restablecer tipos específicos de células inmunes que se hayan perdido como resultado de una enfermedad o de una terapia. A título de ejemplo, en el caso de la quimioterapia contra el cáncer, se utiliza la eritropoyetina para reemplazar los eritrocitos, empleándose el factor de estimulación de las colonias de granulocitos (G-CSF) para reemplazar neutrófilos y el factor de estimulación de las colonias macrófagas de granulocitos (GM-CSF) es empleado para reemplazar granulocitos y macrófagos. Aún cuando estos fármacos proteicos son beneficiosos, tienen una vida media en suero relativamente corta de tal manera, que frecuentemente, es insuficiente el reemplazo de las células inmunes. De igual modo, en el momento actual se utiliza en clínica un tratamiento no específico para estimular específicamente el desarrollo de las células T o B, aún cuando se sabe que la pérdida de estas células, como resultado de una enfermedad o después de ciertos tratamientos mieloablativos, es particularmente nociva para la salud de un paciente. Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica para desarrollar estimuladores y restauradores del sistema inmune, en particular existe una necesidad de linfocitos, que tengan una vida media en suero prolongada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a proteínas de fusión de interleuquina-7 (IL-7) que tienen propiedades biológicas mejoradas en comparación con las correspondientes proteínas de IL-7 de tipo silvestre. Así pues, la presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que las proteínas de fusión de IL-7, que tienen características estructurales particulares, tienen propiedades biológicas mejoradas en comparación con la IL-7 recombinante de tipo silvestre.

De manera alternativa, las proteínas de fusión de IL-7 han sido descritas en la publicación WO 02/079232(Lexigen) y en la publicación WO 04/018681 (Cytheris). La publicación WO 04/018681 depositada antes que esta invención, pero publicada más tarde, describe constructos de fusión, en los que conformeros de IL-7, que comprenden modificaciones en la secuencia de aminoácidos de IL-7, que consisten en tres puentes de disulfuro Cys:1-4 (Cys2 - Cys92), 2-5 (Cys34-Cys129) y 3-6 (Cys47-Cys141), están funcionalmente ligados con porciones Fc de una cadena pesada IgG a través de una región bisagra peptídica, siendo dicha IgG una IgG1 o una IgG4 humana. Estos constructos específicos, cuando queden comprendidos en el alcance de la reivindicación 1, quedan explícitamente excluidos de la siguiente descripción de la invención.

Por lo tanto, la invención se refiere, en un aspecto, a una proteína de fusión que incluye una primera porción, que comprende una cadena de inmunoglobulina (Ig) y una segunda porción, que comprende la interleuquina-7 (IL-7), en la que la proteína de fusión de IL-7 tiene una actividad biológica incrementada, tal como una vida media en suero mayor o favorece la supervivencia o la expansión de las células inmunes, en comparación con el tipo silvestre de IL-7.

En una realización, la invención se refiere a una proteína de fusión, que incluye una primera porción, que comprende una cadena de Ig, y un segunda porción que incluye la IL-7, en la que los residuos de aminoácido en las posiciones 70 y 91 de la IL-7 están glicosilados y el residuo de aminoácido en la posición 116 de la IL-7 no está glicosilado. Las posiciones de aminoácido de la IL-7 se refieren, a través de este documento, a las posiciones correspondientes en la secuencia humana de IL-7, madura. En una realización, el residuo de aminoácido en la posición 116 de la IL-7 es asparagina. En otra realización, el residuo de aminoácido en la posición 116 de la IL-7 está alterado de tal manera que no sirve como locus de glicosilación. En otra realización, la mitad IL-7 comprende enlaces de disulfuro entre Cys2 y Cys92, entre Cys34 y Cys129, y entre Cys47 y Cys141 de la IL-7, bajo la condición indicada en la reivindicación 1.

En otra realización, la invención incluye una proteína de fusión que comprende una primera porción, que incluye una cadena de Ig y una segunda porción que incluye la IL-7, en la que la IL-7 comprende enlace disulfuro entre Cys2 y Cys92, entre Cys34 y Cys 129, y entre Cys47 y Cys141 de la IL-7 con la condición indicada en la reivindicación 1. En una realización, el residuo de aminoácido en la posición 116 de la IL-7 no está glicosilado. En otra realización,

ES 2 305 886 T3

el residuo de aminoácido en la posición 116 de la IL-7 es la asparagina o está alterado de tal manera que ya no sirva como locus para la glicosilación. En otra realización, los residuos de aminoácido en las posiciones 70 y 91 de la IL-7 están glicosilados.

5 La cadena de Ig es, en general, un anticuerpo intacto o una parte del mismo, tal como una región Fc. La cadena de Ig de la proteína de fusión de IL-7 puede derivarse de cualquier isotipo conocido de Ig y puede incluir, como mínimo, una porción de uno o varios dominios constantes. A título de ejemplo, el dominio constante puede elegirse entre el grupo formado por una región CH1, por una región bisagra, por una región CH2 y por una región CH3. En una realización, la mitad de Ig incluye una región bisagra, una región CH2 y una región CH3. La cadena de Ig está
10 conectada, de manera opcional, con la porción de IL-7 por medio de un ligando.

En la presente invención se admiten las mitades de Ig de un isotipo de anticuerpo simple, tal como IgG1 o IgG2, y las mitades híbridas de Ig. A título de ejemplo, en una realización, la mitad Ig incluye una región bisagra derivada de un isotipo (por ejemplo IgG2) y una región CH procedente de otro isotipo (por ejemplo IgG1). De manera ventajosa,
15 una cadena de Ig, que incluya una porción Fc de IgG1, puede ser modificada para incluir las mutaciones Asn297Gln y Tyr296Ala.

De igual modo, puede modificarse de manera ventajosa una cadena de Ig, que incluya una porción Fc de IgG2, con el fin de que incluya las mutaciones Asn297Gln y Phe296Ala.
20

La porción IL-7 de la proteína de fusión de IL-7, que se ha descrito precedentemente, puede comprender la porción madura de la porción IL-7. En una realización, la porción IL-7 puede incluir, además, una eliminación, tal como una eliminación interna. En un ejemplo, la IL-7 puede incluir una eliminación de dieciocho aminoácidos de los aminoácidos 96 hasta 114 de la SEQ ID NO:1.
25

En otras realizaciones, la invención incluye ácidos nucleicos purificados que codifican las proteínas de fusión de IL-7 descritas precedentemente y células huésped cultivadas que incluyen estos ácidos nucleicos.

En otro aspecto, la invención incluye un procedimiento para la preparación de una proteína de fusión de IL-7 que incluye la expresión en una célula huésped del ácido nucleico precedentemente descrito y la recolección de la proteína de fusión.
30

En otro aspecto, la invención incluye una composición, tal como una composición farmacéutica que incluye la proteína de fusión, que ha sido descrita precedentemente.
35

En otro aspecto, la invención incluye un procedimiento para la obtención de composiciones para el tratamiento de un paciente mediante la administración de proteínas de fusión de Fc-IL-7.

Breve descripción de los dibujos 40

La figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de la IL-7 humana (SEQ ID NO:1). La secuencia señal se ha mostrado en negrita. De igual modo se ha representado en negrita y en cursiva un segmento de dieciocho aminoácidos que puede ser sometido a eliminación a partir de la secuencia de la IL-7.

45 La figura 2 representa la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de ternera (SEQ ID NO:2). La secuencia señal se ha mostrado en negrita.

La figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de cordero (SEQ ID NO:3). La secuencia señal se ha mostrado en negrita.
50

La figura 4 representa la secuencia de aminoácidos de la Fc γ 1-IL-7 humana, madura (SEQ ID NO:4).

La figura 5 representa la secuencia de aminoácidos de la Fc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 humana, madura (SEQ ID NO:5).

55 La figura 6 representa la secuencia de aminoácidos de la Fc γ 1(ligando1)-IL-7 humana, madura (SEQ ID NO:6).

La figura 7 representa la secuencia de aminoácidos de la Fc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7 humana, madura (SEQ ID NO:7).

60 La figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de la Fc γ 1(YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7 humana, madura (SEQ ID NO:8).

La figura 9 representa la secuencia de ácidos nucleicos de la región Fc de la Fc γ 1-IL-7 humana (SEQ ID NO:22).

65 La figura 10 representa la secuencia de ácidos nucleicos de la región Fc de la Fc γ 1(YN>AQ)-IL-7 humana (SEQ ID NO:21).

La figura 11 es la secuencia de ácidos nucleicos de la región Fc de la Fc γ 2(h)-IL-7 humana (SEQ ID NO:20).

ES 2 305 886 T3

La figura 12 es la secuencia de ácidos nucleicos de la región Fc de la Fcγ2(h) (FN>AQ)-IL-7 humana (SEQ ID NO:19).

La figura 13 es una representación gráfica del perfil farmacocinético de la IL-7 humana recombinante (cuadrados vacíos) y de la proteína de fusión de Fcγ2(h)(FN>AQ)-IL-7 (rombos vacíos) del ejemplo 7. La concentración en suero de la proteína de fusión de IL-7 administrada (en ng/ml) se midió a través del tiempo (en horas).

La figura 14 es una representación gráfica de la reconstitución de las células B en ratón irradiado, trasplantado con médula ósea, tratado con la IL-7 humana recombinante (símbolos vacíos), con la Fc-IL-7 humana (símbolos rellenos) o con la PBS (X). Las proteínas se administraron un día sí y otro no (cuadrados) o una vez a la semana (triángulos). La línea en trazos discontinuos representa la concentración en las células B en el ratón donante.

La figura 15 es una representación gráfica de la reconstitución de las células T en ratones irradiados, trasplantados con médula ósea, tratados con la IL-7 humana recombinante (símbolos vacíos), con la Fc-IL-7 humana (símbolos rellenos) o con la PBS (X). Las proteínas se administraron un día sí y otro no (cuadrados) o una vez a la semana (triángulos). La línea en trazos discontinuos representa la concentración en células T en el ratón donante.

La figura 16 es una representación del trazado en puntos de las poblaciones de linfocitos de muestras procedentes de la sangre (fila superior) y procedentes de la bilis (fila inferior) de ratón irradiado, trasplantado con médula ósea, tratado con la huFcγ2(h)(FN>AQ)-IL-7 (primeras dos columnas); y de controles no tratados (última columna). La primera columna representa los linfocitos endógenos reconstituidos (CD45.2+), y la segunda columna representa los linfocitos del donante reconstituidos (CD45.1+). Los linfocitos T, detectados como células positivas CD3, están mostrados en el cuadrante derecho inferior. Los linfocitos B, detectados como células positivas B220, están representados en el cuadrante izquierdo superior.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona proteínas de fusión de IL-7 que tienen una actividad biológica reforzada en comparación con las proteínas de IL-7 de tipo silvestre. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión de IL-7 que incluyen una porción de inmunoglobulina (Ig). Estas proteínas de fusión de Ig-IL-7 tienen una actividad biológica reforzada, tal como una vida media en suero acrecentada en comparación con la de las proteínas de IL-7 de tipo silvestre, lo que las hace adecuadas para el empleo en el tratamiento de condiciones acompañadas por deficiencias de las células inmunes, tales como las deficiencias de linfocitos.

De igual modo, la invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que las proteínas de fusión de IL-7 que tienen características estructurales particulares, tienen, asimismo, propiedades biológicas reforzadas. Mientras que la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de mamíferos es perfectamente conocida, sigue estando mal definida la información sobre la estructura de las proteínas de IL-7 derivadas por vía eucariota, con inclusión, por ejemplo, del modo en que se pliega la proteína y los efectos de su locus de glicosilación N-ligados, previstos, sobre su actividad biológica. A título de ejemplo, la proteína de IL-7 humana tiene una cisteína en las posiciones 2, 34, 47, 92, 129, y 141 de la proteína madura y tres locus de glicosilación N-ligados potenciales en las posiciones de asparagina (Asn)70, Asn91, y Asn116. Sin embargo, no se conoce la estructura precisa de la IL-7 sintetizada bajo condiciones eucariotas.

La presente invención incluye proteínas de fusión de IL-7, que tienen formas estructurales particulares y una actividad biológica reforzada. A título de ejemplo, las proteínas de fusión de IL-7 tienen la pauta de enlace de disulfuro de Cys2-Cys92, Cys34-Cys129 y Cys47-141 con la condición de la reivindicación 1, son más activas *in vivo* que la proteína de IL-7 recombinante de tipo silvestre.

Por otro lado, la invención proporciona una forma de una proteína de fusión de IL-7 en la que únicamente están glicosilados dos de los tres locus de glicosilación N-ligados potenciales de la IL-7. De manera específica, están glicosilados Asn70 y Asn91 de la proteína madura, mientras que no está glicosilado en la IL-7 el locus Asn116 de glicosilación N-ligado previsto. Una proteína de fusión de IL-7 de este tipo es más activa *in vivo* que la IL-7 recombinante de tipo silvestre.

La invención incluye asimismo proteínas de fusión de IL-7 en las que la mitad IL-7 contiene una eliminación y que retiene una actividad comparable con respecto a la que corresponde a las proteínas de fusión de IL-7 no modificadas. A título de ejemplo, la invención proporciona una forma de Ig-IL-7 en la que la mitad IL-7 contiene una eliminación interna de dieciocho aminoácidos que corresponde a la secuencia VKGRKPAALGEAQPTKSL (SEQ ID NO:9).

Proteínas de fusión de interleuquina-7

De manera típica, la porción de proteína de IL-7 está fusionada con una proteína portadora. En una realización, la proteína portadora está dispuesta hacia el extremo N de la proteína de fusión y la proteína de IL-7 está dispuesta hacia el extremo C. En otra realización, la proteína de fusión de IL-7 está dispuesta hacia el extremo N de la proteína de fusión y la proteína portadora está dispuesta hacia el extremo C.

Tal como se usa aquí, el término “interleuquina-7” o “IL-7” significa polipéptidos de IL-7 y derivados y análogos de los mismos que tengan una identidad substancial en la secuencia de aminoácidos con respecto a las IL-7 de

mamíferos, maduras, de tipo silvestre y que tengan substancialmente una actividad biológica equivalente, es decir en bioensayos normalizados o en ensayos de afinidad de enlace del receptor de la IL-7. Por ejemplo, IL-7 se refiere a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido recombinante o no recombinante, que tenga una secuencia de aminoácidos de: i) una variante alélica, que se presente de manera nativa o natural de un polipéptido de IL-7, ii) un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de IL-7, iii) un polipéptido biológicamente activo análogo al polipéptido de IL-7, o iv) una variante biológicamente activa de un polipéptido de IL-7. Los polipéptidos de IL-7, de conformidad con la invención, pueden obtenerse a partir de cualquier especie, por ejemplo de los seres humanos, de ternera o de cordero. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácido de la IL-7 son perfectamente conocidas en el estado de la técnica. A título de ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la IL-7 humana tiene un número de acceso a la genoteca de NM 000880 (SEQ ID NO:1) y se ha mostrado en la figura 1; la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de ratón tiene un número de acceso a la genoteca de NM 008371; la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de rata tiene un número de acceso a la genoteca de AF 367210; la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de ternera tiene un número de acceso a la genoteca de NM 173924 (SEQ ID NO:2) y se ha mostrado en la figura 2; y la secuencia de aminoácidos de la IL-7 de cordero tiene un número de acceso a la genoteca de U10089 (SEQ ID NO:3) y se ha mostrado en la figura 3. La secuencia señal para cada una de las especies polipéptidas se ha mostrado en negrita en cada una de las figuras y, de manera típica, no se ha incluido cuando la porción de IL-7 esté fusionada en el extremo C de la proteína portadora.

Se ha definido una “variante” de una proteína de IL-7 como una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o por varios aminoácidos. La variante puede tener cambios “moderados”, cuando un aminoácido substituido tenga propiedades similares desde el punto de vista estructural o químico, por ejemplo cuando se substituya la leucina por isoleucina. En casos más raros, una variante puede tener cambios “no moderados”, por ejemplo la substitución de una glicina por un triptofano. De igual modo las variaciones menores similares pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácido, o ambas. Pueden encontrarse guías para determinar que residuos de aminoácidos y cuantos residuos de aminoácidos pueden ser substituidos, insertados o sometidos a eliminación sin eliminar la actividad biológica mediante el empleo de programas de ordenador perfectamente conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo programas de ordenador para el modelado molecular o para la formación de alineamientos. Las proteínas de IL-7, comprendidas en la invención, incluyen proteínas de IL-7 que retienen la actividad de IL-7. Los polipéptidos de IL-7, que incluyen asimismo adiciones, substituciones o deleciones están abarcados en la invención en tanto en cuanto las proteínas mantengan una actividad substancialmente equivalente a la actividad biológica de la IL-7. A título de ejemplo, quedan abarcados por la invención los truncamientos de IL-7 que retengan una actividad biológica comparable a la de la forma con la longitud completa de la proteína de IL-7. La actividad de la proteína de IL-7 puede medirse con el empleo de ensayos de proliferación celular *in vitro* tal como se ha descrito en el ejemplo 6 más adelante. La actividad de las variantes de la IL-7, de conformidad con la invención, mantienen la actividad biológica al menos en un 10%, en un 20%, en un 40%, en un 60%, pero de manera más preferente en un 80%, en un 90%, en un 95% y de una manera aún más preferente en un 99% en comparación con la IL-7 de tipo silvestre.

Las proteínas de IL-7 variantes incluyen también polipéptidos que tengan una identidad de secuencia de, al menos, aproximadamente un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 92%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98%, un 99%, o por encima de este valor con la IL-7 de tipo silvestre. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácido o de dos ácidos nucleicos, las secuencias son alineadas con objeto de efectuar una comparación óptima (por ejemplo pueden ser introducidas lagunas en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo con un segundo aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (por ejemplo, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones·veces·100). La determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede llevarse a cabo mediante el uso de un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, modificado como en la publicación de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77. Un algoritmo de este tipo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de los autores Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las investigaciones de nucleótidos por medio de BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, tamaño de la palabra = 12. Las investigaciones con la proteína BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, tamaño de la palabra = 3. Con objeto de obtener alineamientos con lagunas, con fines comparativos, puede utilizarse el BLAST con lagunas como se ha descrito en la publicación de los autores Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Research 25(17):3389-3402. Cuando se utilicen los programas BLAST y XBLAST con lagunas, podrán ser empleados parámetros de defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Los epitopos potenciales de las células T o de las células B en la mitad IL-7 pueden ser eliminados o modificados en las proteínas de fusión de Fc-IL-7 de la invención. A título de ejemplo se han descrito mitades de IL-7 desprovistas de inmunidad en la solicitud de patente provisional norteamericana titulada “Variantes de IL-7 con inmunogenicidad reducida -IL-7 Variants with Reduced Immunogenicity-” (número de expediente del agente de la propiedad industrial LEX-035PR), que fue depositada en la oficina de patentes y marcas de los Estados Unidos el 9 de diciembre de 2004.

Proteína portadora

La proteína portadora puede ser cualquier mitad fusionada de manera covalente con la proteína de IL-7. En una realización, la proteína portadora es la albúmina, por ejemplo, es albúmina de suero humano. En otra realización, la proteína portadora es una mitad de inmunoglobulina (Ig), tal como una cadena pesada de Ig. La cadena de Ig puede derivarse de IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. De conformidad con la invención, la mitad Ig puede formar un anticuerpo

ES 2 305 886 T3

intacto y puede dirigir la proteína de fusión de IL-7 hacia locus diana específicos en el cuerpo. El técnico en la materia conoce las proteínas de fusión, que utilizan como diana un anticuerpo. En otra realización, la mitad Ig portadora comprende, además, una cadena ligera de Ig.

5 En una realización, la mitad Ig comprende una región Fc. Tal como se utiliza en este caso, la “porción Fc” abarca dominios derivados de la región constante de una inmunoglobulina, de manera preferente de una inmunoglobulina humana, con inclusión de un fragmento, un análogo, una variante, un mutante o un derivado de la región constante. Las inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y otras clases. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido, que se presenta de manera natural o que se obtiene por vía de síntesis, que es homólogo a la región del extremo C de la inmunoglobulina, y que puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, independientemente o en cualquier combinación. En la presente invención, la porción Fc incluye, de manera típica, al menos un dominio CH2. A título de ejemplo, la porción Fc puede incluir bisagra-CH2-CH3. De manera alternativa, la porción Fc puede incluir la totalidad o una porción de la región bisagra, del dominio CH2 y/o del dominio CH3 y/o del dominio CH4.

15 La región constante de una inmunoglobulina es responsable de muchas funciones anticuerpo importantes, con inclusión del enlace del receptor Fc (FcR) y la fijación del complemento. Existen cinco clases principales de región constante de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, y IgM. A título de ejemplo, la IgG está subdividida en cuatro subclases: 1, 2, 3 y 4, conocidas también como IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, respectivamente.

20 Las moléculas de IgG interactúan con un gran número de clases de receptores celulares, con inclusión de tres clases de receptores Fc γ (Fc γ R) específicos para la clase IgG del anticuerpo, en concreto Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. Se ha descrito que las secuencias importantes para el enlace de IgG con los receptores Fc γ R están localizadas en los dominios CH2 y CH3. La vida media en suero de un anticuerpo está influenciada por la habilidad de este anticuerpo para ligarse sobre el receptor Fc (FcR). De manera similar, la vida media en suero de las proteínas de fusión de inmunoglobulina está influenciada también por la habilidad para ligarse con tales receptores (Gillies *et al.*, (1999) Cancer Res. 59:2159-66). Los dominios de IgG2 e IgG4, en comparación con las de los dominios IgG1, CH2 y CH3, tienen una afinidad de enlace con los receptores Fc bioquímicamente indetectable o reducida. Se ha descrito que las proteínas de fusión de inmunoglobulina, que contienen dominios CH2 y CH3 de IgG2 o de IgG4, ya no tienen vida media en suero en comparación con las proteínas de fusión correspondientes, que contienen los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (patente norteamericana U.S. No. 5,541,087; Lo *et al.*, (1998) Protein Engineering, 11:495-500). Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la invención, los dominios CH2 y CH3 preferidos se derivan de un isotipo anticuerpo con afinidad de enlace con el receptor reducida y funciones de efector tales como, por ejemplo, la IgG2 o la IgG4. De una manera más preferente, los dominios CH2 y CH3 se derivan de IgG2.

35 La región bisagra está localizada, normalmente, en el extremo C con respecto al dominio CH1 de la región constante de cadena pesada. En los isotipos IgG, se producen de manera típica enlaces de disulfuro dentro de la región bisagra, lo que permite que se forme la molécula de anticuerpo tetrámera final. Esta región está dominada por prolina, serinas y treoninas. Cuando se incluya en la presente invención, la región bisagra es, de manera típica, al menos homóloga con la región de inmunoglobulina que se presenta de manera natural, que incluye los residuos de cisteína para formar enlaces de disulfuro que unan las dos mitades Fc. De manera representativa, se conocen en el estado de la técnica secuencias de regiones bisagra de inmunoglobulina humana y de ratón y pueden encontrarse en la publicación de Borrebaeck, ed., (1992) Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman y Co. Las regiones de bisagra adecuadas para la presente invención pueden derivarse de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y de otras clases de inmunoglobulina.

40 La región bisagra IgG1 tiene tres cisteínas, interviniendo la segunda y la tercera de las mismas en los enlaces de disulfuro entre dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina. Estas mismas dos cisteínas permiten el enlace disulfuro eficiente y consistente sobre una porción Fc. Por lo tanto, una región bisagra preferente de la presente invención se deriva de IgG1, de una manera más preferente se deriva de IgG1 humana, en la que la primera cisteína está mutada, de manera preferente, en otro aminoácido, de manera preferente en serina.

55 La región bisagra isotipo IgG2 tiene cuatro enlaces de disulfuro que tienden a favorecer la oligomerización y posiblemente el enlace disulfuro incorrecto durante la secreción en sistemas recombinantes. Una región bisagra adecuada puede derivarse de una bisagra IgG2; cada una de las dos primeras cisteínas está mutada, de manera preferente, por otro aminoácido.

60 Se sabe que la región bisagra de IgG4 forma, de manera ineficiente, enlaces de disulfuro intercatenarios. Sin embargo, una región bisagra adecuada para la presente invención puede derivarse de la región bisagra IgG4, que contenga preferentemente una mutación que refuerce la formación correcta de los enlaces de disulfuro entre mitades de derivados de cadena pesada (Angal *et al.* (1993) Mol. Immunol., 30:105-8).

65 De conformidad con la presente invención, la porción Fc puede contener dominios de CH2 y/o de CH3 y/o de CH4 y una región bisagra que se deriva de diferentes isotipos de anticuerpos diferentes, por ejemplo una porción híbrida Fc. A título de ejemplo, en una realización, la porción Fc contiene dominios de CH2 y/o de CH3 derivados de IgG2 o de IgG4 y una región bisagra mutante derivada de IgG1. Tal como se utiliza en esta solicitud, Fc γ 2(h) se refiere a una realización en la que la bisagra se deriva de IgG1 y los dominios constantes remanentes proceden de IgG2. De manera alternativa, se utiliza una región bisagra mutante procedente de otra subclase de IgG en una porción Fc híbrida. A

título de ejemplo, puede emplearse una forma mutante de la bisagra IgG4 que permita el enlace de disulfuro eficiente entre las dos cadenas pesadas. Por lo tanto una bisagra mutante puede derivarse de una bisagra IgG2 en la que las dos primeras cisteínas estén mutadas por otro aminoácido. Estas porciones Fc híbridas facilitan la expresión a alto nivel y mejoran el ensamblaje correcto de las proteínas de fusión de Fc-IL-7. El ensamblaje de tales porciones Fc híbridas es conocido en el estado de la técnica y se ha descrito en la solicitud de patente norteamericana, publicada, U.S. No. 2003-0044423.

En algunas realizaciones, la porción Fc contiene modificaciones de aminoácido que, en general, amplían la vida media en suero de una proteína de fusión Fc. Tales modificaciones de aminoácido incluyen mutaciones que disminuyen substancialmente o que eliminan el enlace receptor Fc o que complementan la actividad de fijación. A título de ejemplo, puede eliminarse el locus de glicosilación dentro de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En IgG1, el locus de glicosilación es Asn297 dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Tyr-Asn-Ser (SEQ ID NO:30). En otros isotipos de inmunoglobulina, el locus de glicosilación corresponde a Asn297 de IgG1. A título de ejemplo, el locus de glicosilación en IgG2 y en IgG4, es la asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:29). Por lo tanto, una mutación de Asn297 de IgG1 elimina el locus de glicosilación en la porción Fc derivada de IgG1. En otra realización, Asn297 está reemplazada por Gln. En otra realización, está mutada además la tirosina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Tyr-Asn-Ser (SEQ ID NO:30) para eliminar un epítipo de las células T potencialmente no autónomo que resulta de la mutación de la asparagina. En el sentido aquí empleado, un epítipo de las células T es una secuencia de polipéptido en una proteína que interactúa con o que liga una molécula MHC clase II. A título de ejemplo, la secuencia de aminoácidos Gln-Tyr-Asn-Ser (SEQ ID NO:30) dentro de una cadena pesada IgG1 puede reemplazarse por una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser (SEQ ID NO:28). De manera similar, una mutación en IgG2 o en IgG4 de asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:29) elimina el locus de glicosilación en la porción Fc derivada de la cadena pesada IgG2 o IgG4. En una realización, la asparagina es reemplazada por una glutamina. En otras realizaciones, se somete a la fenilalanina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:29) a otra mutación para eliminar un epítipo de las células T potencialmente no autónomo que resulta de la mutación de la asparagina. A título de ejemplo, la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:29) puede ser reemplazada dentro de la cadena pesada IgG2 o IgG4 por una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser (SEQ ID NO:28).

De igual modo, se ha observado que la alteración de aminoácidos cerca de la unión de la porción Fc y de la porción no Fc puede incrementar decisivamente la vida media en suero de la proteína de fusión de Fc (solicitud de patente norteamericana, publicada, U.S. No. 2002-0147311). Por lo tanto, la región de unión de una proteína de fusión de Fc-IL-7 o IL-7-Fc de la presente invención puede contener alteraciones que se encuentren de manera preferente aproximadamente a una distancia de 10 aminoácidos desde el punto de unión, con relación a las secuencias que se presentan de manera natural de una cadena pesada de inmunoglobulina y de IL-7. Estos cambios de aminoácido pueden provocar un incremento de la hidrofobicidad mediante el cambio, por ejemplo, del extremo C de lisina de la porción Fc en un aminoácido hidrófobo tal como alanina o leucina. Según otra realización, de conformidad con la invención, se somete a eliminación la lisina del extremo C y a la glicina precedente de la porción Fc.

En otras realizaciones, la porción Fc contiene alteraciones de aminoácido del segmento Leu-Ser-Leu-Ser en las proximidades del extremo C de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las sustituciones de aminoácido del segmento Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:27) eliminan los epítopos de las células T de unión potencial. En una realización, la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:27) próxima al extremo C de la porción Fc está reemplazada por una secuencia de aminoácidos Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO:26). En otras realizaciones, los aminoácidos del segmento Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:27) están reemplazados por otros aminoácidos tales como la glicina o la prolina. Se han descrito, en la solicitud de patente norteamericana, publicada, U.S. No. 2003-0166877, métodos detallados para la generación de sustituciones de aminoácido del segmento Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:27) próximo al extremo C de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o de otras moléculas de la clase de la inmunoglobulina, así como también otras modificaciones ejemplificativas para alterar los epítopos de las células T de unión.

Espaciador

En una realización se inserta un espaciador o péptido ligante entre la proteína portadora y la proteína de fusión de IL-7. A título de ejemplo, el espaciador está colocado inmediatamente en el extremo C del último aminoácido de la región constante de Ig. De manera preferente, el espaciador o péptido ligante no está cargado y, de una manera más preferente, no es polar ni es hidrófobo. La longitud de un espaciador o péptido ligante está comprendida, de manera preferente, entre 1 y aproximadamente 100 aminoácidos, de una manera más preferente está comprendida entre 1 y aproximadamente 50 aminoácidos, o está comprendida entre 1 y aproximadamente 25 aminoácidos, y de una manera más preferente está comprendida entre 1 y aproximadamente 15 aminoácidos, y de una manera todavía más preferente es menor que 10 aminoácidos. En una realización, el espaciador contiene una secuencia $(G_4S)_n$, en la que n toma un valor menor que 5. En una realización preferida, el espaciador contiene la secuencia G_4SG_4 (SEQ ID NO:25). Asimismo en otra realización, el espaciador contiene un motivo que es reconocido como un locus de glicosilación N-ligado. Asimismo en otra realización, el espaciador contiene un motivo que es reconocido por un agente de excisión específico del locus. En una realización alternativa, de conformidad con la invención, la proteína portadora y la proteína de fusión de IL-7 están separadas por un espaciador sintético, por ejemplo un espaciador PNA, que, de manera preferente, no está cargado y, de manera más preferente, no es polar ni es hidrófobo.

Producción de las proteínas de fusión de IL-7

En los ejemplos se han descrito procedimientos, no limitativos, para la síntesis de realizaciones adecuadas de la invención, así como ensayos adecuados para la experimentación de las propiedades *in vitro* y las actividades farmacocinéticas y las actividades *in vivo* en modelos animales.

Las proteínas de fusión de IL-7 de la invención pueden ser producidas mediante la utilización de vectores de expresión recombinantes conocidos en el estado de la técnica. El término "vector de expresión" se refiere a un constructo de ADN replicable usado para la expresión de ADN que codifica la proteína de fusión de IL-7 deseada y que incluye una unidad de transcripción que comprende un ensamblaje de (1) uno o varios elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o reforzadores, ligados de manera operativa con (2) una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de IL-7 deseada que se transcribe en el ARNm y que se traduce en la proteína, y (3) secuencias apropiadas de iniciación y de terminación de transcripción y de traducción. La elección del promotor y de los elementos de regulación varía, en general, de acuerdo con la célula huésped prevista. Un vector de expresión preferido, se conformidad con la invención, es un vector de expresión de Fc derivado del vector de expresión PdCs-huFc descrito en la publicación de Lo *et al.*, Protein Engineering (1998)11:495.

En un ejemplo preferido, el ácido nucleico, que codifica la proteína de fusión de IL-7, es transfectado hasta una célula huésped usando técnicas de ADN recombinante. En el contexto de la presente invención, el ADN exógeno incluye una secuencia que codifica la proteína de la invención. Las células huésped adecuadas incluyen las células procariotas, de levadura o las células eucariotas superiores. Las células huésped preferidas, son las células eucariotas.

Las proteínas de fusión de IL-7 recombinantes pueden ser expresadas en huéspedes de levadura, preferentemente de las especies *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*. De igual modo pueden emplearse levaduras de otros géneros tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contienen, de manera general, un origen de replicación procedente de un plásmido de levadura o una secuencia de replicación autónoma (ARS), un promotor, un ADN que codifica la proteína de fusión de IL-7, secuencias para la terminación de la poliadenilación y de la transcripción y un gen de selección. Las secuencias promotoras adecuadas en los vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa u otros enzimas glicolíticos, tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, la hexocinasa, la piruvatodescarboxilasa, la fosfofructocinasa, la glucosa-4-fosfatoisomerasa, la 3-fosfogliceratomutasa, la piruvatocinasa, la triosafosfatosisomerasa, la fosfoglucosaisomerasa y la glucocinasa.

Para la expresión de la proteína recombinante pueden emplearse varios sistemas de cultivo de células de mamíferos o de insectos. En el estado de la técnica se conocen perfectamente sistemas de baculovirus para la producción de proteínas en células de insectos. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos, adecuadas, incluyen las células NS/0, las células L, la C127, la 3T3, el ovario de hámster chino (CHO), la HeLa y las líneas de células BHK. De manera adicional, las células huésped de mamíferos, adecuadas, incluyen las células CV-1 (ATCC CCL70) y las células COS-7, derivándose ambas del riñón de mono. Otra línea celular de riñón de mono adecuada, la CV-1/EBNA, se derivó mediante transfección de la línea celular CV-1 con un gen que codifica el antígeno-1 nuclear de virus de Epstein-Barr (EBNA-1) y con un vector que contiene secuencias reguladoras de CMV (McMahan *et al.*, (1991) EMBO J. 10:2821). El gen EBNA-1 permite la replicación episomal de vectores de expresión, tales como el HAV-EO o el pDC406, que contienen el origen EBV de la replicación.

Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de la replicación, un promotor adecuado y un reforzador ligado con el gen que debe ser expresado, y otras secuencias no transcritas que flanquean 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como locus necesarios para el enlace del ribosoma, locus para una poliadenilación, locus para el donante y el aceptor de empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los promotores y los reforzadores, que son empleados de manera usual, se derivan de polioma, de adenovirus 2, de virus de simio 40 (SV40) y de citomegalovirus humano. Pueden emplearse secuencias de ADN derivadas del genoma vírico SV40, por ejemplo locus del promotor de origen, incipiente y tardío, de reforzador, de empalme y de poliadenilación para proporcionar los otros elementos genéticos requeridos para la expresión de una secuencia de ADN heteróloga.

El vector de expresión, para la secreción de la proteína de fusión de IL-7 a partir de la célula huésped, comprende ADN que codifica un péptido señal o un péptido conductor. En la presente invención puede emplearse ADN que codifique la secuencia señal nativa de IL-7 o, de manera alternativa, puede emplearse un ADN que codifique una secuencia señal heteróloga, tal como la secuencia señal procedente de otra interleuquina o procedente de una molécula de Ig secretada.

De igual modo, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las proteínas recombinantes de la presente invención, que incluye el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de IL-7 bajo condiciones promotoras de la expresión. A continuación se purifica la proteína deseada, a partir del medio de cultivo o de los extractos celulares. A título de ejemplo, pueden concentrarse, en primer lugar, los sobrenadantes procedentes de los sistemas de expresión que secretan la proteína recombinante en el medio de cultivo empleándose un filtro para la concentración de proteínas usual en el comercio, por ejemplo una unidad para la ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa

de concentración, el concentrado puede ser aplicado a una matriz de purificación adecuada, como se conoce en el estado de la técnica. A título de ejemplo, las proteínas de fusión de Fc-IL-7 son capturadas de manera conveniente mediante el empleo de una matriz copulada con la proteína A.

5 Una proteína de fusión de IL-7 “aislada” o “purificada” o una porción biológicamente activa de la misma está substancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o de la fuente tisular a partir de la cual se deriva la proteína de fusión de IL-7, o está substancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se haya sintetizado por vía química. El concepto de “substancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de la proteína de fusión de IL-7 en las que la proteína esté separada
10 de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se ha aislado o se ha obtenido por recombinación. En otra realización, el concepto de “substancialmente libre de material celular” incluye las preparaciones de la proteína de fusión de IL-7 que tengan menos de aproximadamente un 30% (en peso seco) de proteína de fusión de no-IL-7 (es decir indicado aquí como “proteína contaminante”), de una manera más preferente una proporción menor que un 20% de proteína de fusión de no-IL-7, de una manera aún más preferente menor que un 10% de proteína de fusión de no-IL-7, y de una manera más preferente menor que un 5% de proteína de fusión de no-IL-7. Cuando se purifique la proteína de fusión de IL-7, o la porción biológicamente activa de la misma, a partir de una fuente recombinante, estará exenta también, de manera substancialmente preferible, de medio de cultivo, *por ejemplo* el medio de cultivo representa una proporción menor que aproximadamente el 20%, de una manera más preferente una proporción menor que el 10%, y de una manera muy especialmente preferente menor que aproximadamente un 5% del volumen de la
20 preparación de proteína.

El término “proteína de fusión de Ig-IL-7 substancialmente pura” se refiere a una preparación en la que la proteína de fusión de Ig-IL-7 constituye al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de las proteínas en la preparación. En una realización, la invención incluye preparaciones substancialmente puras de proteínas de fusión de
25 Ig-IL-7 que tienen una pauta de enlace de disulfuro de entre Cys2 y Cys92, entre Cys34 y Cys129 y entre Cys47 y Cys141 con la condición de la reivindicación 1. En otra realización, la invención se refiere a preparaciones substancialmente puras de proteínas de fusión de Ig-IL-7 en las que el Asn116 no está glicosilado, pero el Asn70 y el Asn91 están glicosilados.

30 *Métodos de tratamiento con el empleo de proteínas FC-IL-7*

Las proteínas de fusión de IL-7 de la invención son adecuadas para el tratamiento de inmunodeficiencias y para acelerar la reconstitución natural del sistema inmune que se produce, por ejemplo, tras enfermedades o tratamientos que son de naturaleza inmunosupresora. A título de ejemplo, las proteínas de fusión de IL-7 pueden ser empleadas
35 para el tratamiento de patógenos infecciosos, de desórdenes inmunes y para reforzar el crecimiento (con inclusión de la proliferación) de tipos de células inmunes específicos. De igual modo, las proteínas de fusión de IL-7 pueden ser empleadas para el tratamiento de tipos de cáncer tales como el cáncer de vejiga, el cáncer de pulmón, el cáncer de cerebro, el cáncer de mama, el cáncer de piel y el cáncer de próstata. En un ejemplo, es conveniente tratar con proteínas de fusión de IL-7 a pacientes que hayan estado sometidos a uno o varios ciclos de quimioterapia, como se ha descrito precedentemente para ayudar a que se restablezcan sus células inmunes. De manera alternativa, las proteínas de fusión de IL-7 son adecuadas en trasplantes con incorporación de células T. A título de ejemplo, las proteínas de fusión de IL-7 pueden ser administradas para facilitar la expansión y la supervivencia de las células T trasplantadas, o para ampliar las poblaciones de células T aisladas *ex vivo*. De manera alternativa, es conveniente también administrar las proteínas de fusión de IL-7 descritas precedentemente a pacientes con VIH, a pacientes de edad avanzada que
45 reciban un trasplante o a otros pacientes con función reprimida del sistema inmune.

Administración

Las proteínas de fusión de IL-7 de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración. Tales composiciones comprenden, de manera típica, la proteína de fusión de IL-7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, el concepto de “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, de los medios de dispersión, de los agentes de revestimiento, de los agentes antibacterianos y de los agentes antifúngicos, de los agentes isotónicos y destinados a retardar la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El empleo de tales medios y de tales agentes para
55 sustancias con actividad farmacéutica es perfectamente conocido en el estado de la técnica.

Una composición farmacéutica, de conformidad con la invención, está formulada de modo que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, la administración oral (por ejemplo por inhalación), la administración
60 transdérmica (tópica), la administración a través de la mucosa y la administración rectal. Las soluciones o las suspensiones empleadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico o los metilparabenos; los antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfito de sodio; agentes para formación de quelatos tal como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como el cloruro de sodio o la dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o con bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encontrarse en ampollas, en jeringas listas para su utilización o en viales para dosis múltiples, contruidos por vidrio o por plástico.

ES 2 305 886 T3

Los medicamentos, que contienen las proteínas de fusión de IL-7, de conformidad con la invención, pueden tener una concentración comprendida entre un 0,01 y un 100% (p/p), pudiendo variar la cantidad de acuerdo con la forma de dosificación de los medicamentos.

5 La dosis de administración depende del peso corporal del paciente, de la gravedad de la enfermedad, y de la opinión del médico. Sin embargo, en general es adecuado administrar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, de manera preferente entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 2 mg/kg y, de una manera más preferente, aproximadamente 0,5 mg/kg en el caso de una inyección. La dosis puede ser administrada de una sola vez o varias veces al día de conformidad con la gravedad de la enfermedad y de la opinión del médico.

10 Las composiciones, de conformidad con la invención, son adecuadas cuando son administradas simultáneamente con uno o varios agentes terapéuticos de otro tipo, por ejemplo una molécula conocida también por ser útil para restablecer las células sanguíneas. A título de ejemplo, la molécula puede ser la eritropoyetina, cuya utilización es conocida para restablecer las células de los eritrocitos, la G-CSF conocida por restablecer los neutrófilos o la GM-CSF conocida por restablecer los granulocitos y los macrófagos.

Ejemplo 1

Clonación de variantes de Fc-IL-7 y huFc-IL-7 humanas (hu)

20 Se amplifica el ácido nucleico, que codifica la forma madura de la IL-7 humana (por ejemplo que carece de su secuencia señal en el extremo N) mediante reacción en cadena de polimerasa (RCP), empleándose cebadores ascendentes y cebadores descendentes (cebadores en el sentido 3' y cebadores en el sentido 5') que incluyen los locus de restricción para Sma I y Xho I, respectivamente. El producto de la RCP, amplificado, es clonado en un vector pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se verifica su secuencia. La secuencia de aminoácidos de la IL-7 madura se ha mostrado como SEQ ID NO:1. El fragmento de IL-7, digerido con Sma I/Xho I, se transfiere hasta un vector de expresión derivado de pdCs-huFc, tratado de manera similar, lo que da por resultado una secuencia quimérica entre huFc e IL-7, con la IL-7 colocada dentro de la estructura, directamente en el sentido descendente de la secuencia que codifica una mitad CH3 de Fc (véase la publicación de Lo *et al.*, Protein Engineering (1998) 11:495).

30 Se divide una serie de vectores de expresión a partir del vector pdCs-huFc, que codifica un fragmento Fc que, por regla general, incluye una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 de Ig, y que se ha modificado genéticamente para que incorpore alteraciones específicas en la región Fc. De este modo, se generó una serie de proteínas de fusión de huFc-IL-7 mediante el lanzamiento del fragmento IL-7 entre estos vectores, que difieren en su estructura Fc. Con el fin de proporcionar las diversas estructuras, pueden introducirse en primer lugar las mutaciones apropiadas dentro de las secuencias Fc con ayuda de métodos conocidos en el estado de la técnica. Puesto que la región Fc del vector derivado pdCs-huFc está flanqueada por un locus de restricción AflII y por un locus de restricción SmaI, el fragmento resultante de ácido nucleico, que codifica Fc, cuando se somete al ácido nucleico con la estructura modificada de manera apropiada a la RCP, empleándose cebadores que incorporen los locus de restricción para AflII y SmaI, respectivamente, puede substituirse entonces en el vector derivado pdCs-huFc en forma de un fragmento AflII para proporcionar un fragmento SmaI. La secuencia CTTAAGC (SEQ ID NO:24) de AflII se encuentra en el sentido ascendente con respecto a la secuencia Fc que comienza con GAGCCAAA (SEQ ID NO:23), que representa el inicio de la región bisagra como se ha mostrado en la figura 20. El locus CCCGGGT (SEQ ID NO:17) de SmaI está dirigido hacia el extremo de la región CH3, como se ha mostrado por medio de los ácidos nucleicos subrayados en la figura 12, y codifica los aminoácidos Pro-Gly, que proceden del residuo de alanina de la mutación de lisina por alanina en el extremo de la región CH3.

45 A título de ejemplo, la huFc γ 1-IL-7 se construye con la región bisagra, los dominios CH2 y los dominios CH3 derivados de la subclase IgG 1. En el contexto de una proteína de fusión de Fc, la región bisagra IgG γ 1 contiene, además, una mutación que substituye la primera cisteína por serina. La secuencia de la proteína de fusión codificada está representada en la figura 4 (SEQ ID NO:4), mientras que la secuencia en SEQ ID NO:22 codifica la estructura madura huFc γ 1 del vector.

55 De igual modo, se generaron proteínas de fusión de Fc γ 1-IL-7, que incluyen la mutación dipéptida YN para dar AQ con el fin de eliminar el locus de glicosilación en Fc (que corresponde a N297 en IgG γ 1) así como un epitopo de las células T potencialmente inmunogénico, de acuerdo con los métodos descritos precedentemente. La secuencia de la estructura Fc madura de la huFc γ 1(YN>AQ) ha sido descrita en la SEQ ID NO:21. La substitución de alanina y de glicina en lugar de la tirosina y de la asparagina se llevó a cabo en la primera introducción de mutaciones en la estructura Fc por medio de una RCP solapada. Se emplearon dos cebadores mutagénicos complementarios solapantes para generar dos fragmentos RCP, que se utilizaron como matriz en una segunda serie de amplificación para producir un fragmento simple que contenga las substituciones de codón apropiadas. El cebador mutagénico en el sentido codificante fue 5'-AGCAGGCCAGAGCACGTACCGTGTGGT-3' (mutación subrayada (SEQ ID NO:36). La hebra complementaria fue 5'-GTACGTGCTCTGGGCTGCTCCTCCCGC-3' (SEQ ID NO:37). El cebador ascendente flanqueante fue 5'-CTCTCTGCAGAGCCAAA TCT-3' (SEQ ID NO:38), que contiene también un locus PstI. En el sentido no codificante, el cebador descendente fue 5'-CAGGGTGTACACCTGTGGTTC-3' (SEQ ID NO:33), que contiene también un locus BsrGI. Tras la amplificación, se verificó la secuencia con ayuda de métodos normalizados y se sometió a restricción con BsrGI y PstI. El fragmento resultante se substituyó entonces por el fragmento no mutante de la región Fc.

ES 2 305 886 T3

Por lo tanto, la huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 se construyó usándose las técnicas descritas previamente. Esta proteína de fusión incluye una región bisagra alterada que se derivó de la subclase IgG γ 1, mientras que los dominios CH2 y CH3 se derivaron de la subclase IgG γ 2. De manera adicional, se incluyó la mutación dipéptida de FN para dar AQ con objeto de eliminar el locus de glicosilación en Fc (que corresponde a N297 en IgG γ 1) así como un epitopo de las células T potencialmente inmunogénico. La secuencia de la proteína de fusión codificada se ha descrito en la figura 5 (SEQ ID NO:5). La secuencia de la estructura Fc madura huFc γ 2(h)(FN>AQ) está mostrada en la SEQ ID NO:19.

De manera adicional, se generaron proteínas de fusión de Fc-IL-7 que incluían una secuencia ligante flexible entre la mitad Fc y la mitad IL-7. A título de ejemplo, se insertó un polipéptido ligante con la secuencia GGGGSGGGGSGG GGS (ligando1, SEQ ID NO:34). Para generar la huFc γ 1(ligando1)-IL-7, se insertó un oligonucleótido sintético dúplex de la secuencia 5'-G GGT GCA GGG GGC GGG GGC AGC GGG GGC GGA GGA TCC GGC GGG GGC TC-3' (SEQ ID NO:18) mediante ligación de extremo romo en el único locus SmaI del vector de expresión pdCs-huFc-IL-7 y se verificó la orientación del dúplex. El cebador ascendente se diseñó de tal manera que los residuos de aminoácido Pro-Gly codificados por los codones cubriesen el locus SmaI (C CCG GGT) (SEQ ID NO: 17), y que se mantuviese el residuo Ala siguiente (que resulta de la substitución codificada de lisina para dar alanina) de la región CH3. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión codificada se ha mostrado en la figura 6 (SEQ ID NO:6).

De manera adicional, se construyeron proteínas de fusión de Fc-IL-7 que incluyen un péptido ligante corto con la secuencia GGGGSGGGG (ligando2, SEQ ID NO:25). Para generar la huFc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7, se clonó un producto de RCP amplificado, obtenido a partir del par de cebadores 5'-CCCGGGCGCCGGCGGTGGAG GATCAGGTGGTGGCGGTGATTGTGATATTGAAGGTAAAGATG-3' (que contiene la secuencia ligante codificada, SEQ ID NO:15) y 5'-ATCATGTCTGGATCCCTCGA-3' (SEQ ID NO:14) sobre un plásmido matriz pdCs-Fc-IL-7 apropiado, en un vector pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se verificó su secuencia. A continuación, se transfirió un fragmento digerido Xma I/Xho I que codifica ligando2/IL-7 en un vector de expresión derivado de pdCs-huFc tratado de esta manera similar. El vector se modificó de manera que contuviese la estructura Fc madura huFc γ 1(YN>AQ) de SEQ ID NO:21. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión codificada se ha mostrado en la figura 7 (SEQ ID NO:7).

De manera similar, se generó la huFc γ 1(YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7 mediante la utilización del par de cebadores 5'-CCCGGGCGGTGGAGGATCAGGTG.GT-GG.CGGTGATTGTGATATTGAAGGTAAAGATG-3' (SEQ ID NO:16) y 5'-ATCATGTCTGGATCCCTCGA-3' (SEQ ID NO:12). La huFc γ 1(YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7 difiere de la proteína de fusión, precedente huFc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7, en que carece de los dos residuos terminales de aminoácido de la porción Fc de la proteína de fusión. De manera específica, en lugar de terminar con la secuencia...ATATPGA (SEQ ID NO:11), la porción Fc termina con la secuenciaATATP (SEQ ID NO:10). La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión codificada se ha mostrado en la figura 8 (SEQ ID NO:8).

Ejemplo 2

Transfección y expresión de la proteína de fusión de Fc-IL-7

Se empleó electroporación para introducir el ADN que codifica las proteínas de fusión de IL-7 descritas precedentemente en una línea celular de mieloma de ratón NS/0. Para llevar a cabo la electroporación se cultivaron células NS/0 en medio Dulbecco modificado de Eagle suplementado con un 10% de suero de ternera fetal inactivado por calentamiento, 2 mM de glutamina y penicilina/estreptomicina. Se lavaron aproximadamente 5×10^6 células una vez con PBS y se volvieron a suspender en 0,5 ml de PBS. A continuación se incubaron 10 μ g del ADN plásmido linealizado para la huFc γ 1-IL-7 con las células en una cubeta Gene Pulser (apertura del electrodo 0,4 cm, BioRad) durante 10 minutos sobre hielo. La electroporación se llevó a cabo mediante el empleo de un dispositivo Gene Pulser (BioRad, Hercules, CA) regulado a 0,25 V y 500 μ F. Se dejó que las células se recuperasen durante 10 minutos sobre hielo, después de lo cual se volvieron a suspender en medio de crecimiento y se distribuyeron en dos placas de 96 pocillos.

Los clones transfectados de manera estable se seleccionaron por medio de su tamaño en presencia de 100 nM de metotrexato (MTX), que se añadió al medio de crecimiento dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días durante dos o tres veces más, y aparecieron clones MTX resistentes al cabo de 2 a 3 semanas. Se ensayaron los sobrenadantes procedentes de los clones mediante anti-Fc ELISA para identificar clones que produjeron elevadas cantidades de las proteínas de fusión de IL-7. Los clones de producción elevada se aislaron y se propagaron en medio de crecimiento que contenía 100 nM de MTX. De manera típica, se utilizó un medio de crecimiento exento de suero, tal como medio H-SFM o medio CD (Life Technologies).

Ejemplo 3

Análisis bioquímico de las proteínas de fusión de huFc-IL-7

Se empleó la caracterización de rutina SDS-PAGE para evaluar la integridad de las proteínas de fusión. Se investigaron las diferencias entre las variantes de la huFc-IL-7 constituidas por huFc γ 1-IL-7, huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7, huFc γ 1(ligando1)-IL-7, huFc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7 y huFc γ 1(YN>AQ,d)-IL-7. Las proteínas de fusión de huFc-IL-7, expresadas a partir de células NS/0, se capturaron sobre cuentas de Protein A Sepharose (Repligen, Needham, MA) procedentes del medio de cultivo tisular en el que había sido secretadas y se eluyeron mediante ebullición en tampón de muestra de proteína, con o sin un agente reductor tal como el β -mercaptoetanol. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE y las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción de Coomassie. Las proteínas de fusión

ES 2 305 886 T3

de huFc-IL-7 ensayadas mediante SDS-PAGE estaban bien expresadas en general, puesto que estaban presentes de manera substancial como una banda simple sobre el gel; se encontró que en las muestras de las variantes de huFc-IL-7 que incluían un ligando, estaban sensiblemente reducidas las bandas secundarias, que pueden representar el material recortado.

Las proteínas de fusión de huFc-IL-7, purificadas, se analizaron también mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para evaluar la extensión en que estaban agregadas las variantes de huFc-IL-7. En resumen, se cargó el sobrenadante del cultivo celular en una columna Protein A Sepharose preequilibrada de flujo rápido, la columna se lavó extensamente en un tampón fisiológico (tal como un fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH neutro), y se eluyó la proteína ligada aproximadamente a pH 2,5 hasta 3 en el mismo tampón salino que el precedente. Las fracciones fueron neutralizadas inmediatamente.

Se encontró que era monómero al menos el 50% del producto en cada una de las proteínas de fusión ensayadas y, de manera general, era mayor que el 65%. El concepto de “monómero” como se usa aquí, se refiere a las proteínas no agregadas. Debe entenderse que las proteínas con una porción Fc normalmente forman un complejo ligado mediante disulfuro que, normalmente, incluye dos cadenas polipeptídicas (a menos que las dos porciones de Fc estén presentes en el mismo polipéptido) y puede ser considerada como una “unidad dímera”. Mediante el concepto de “monómero” no se tiene la intención de excluir aquellas especies ligadas por medio de disulfuro sino únicamente quiere indicarse que las proteínas no están agregadas. Para obtener una preparación de la proteína de fusión de huFc-IL-7 virtualmente monómera (aproximadamente al 98%), se cargó el eluato procedente de la purificación mediante Sepharose-Protein A en una columna preparativa SEC (Superdex) y se recogió la fracción del pico monómero. De manera típica, la concentración de la proteína recuperada fue aproximadamente de 1 mg/ml. En caso necesario, se concentró la muestra, por ejemplo, mediante diálisis por centrifugación (por ejemplo VivaSpin) con retención del peso molecular de 10 a 30 kDa.

Enlace de disulfuro

La IL-7 contiene seis residuos de Cys, que podrían establecer enlaces de disulfuro en las posiciones Cys2, Cys34, Cys47, Cys92, Cys129 y Cys141 de la secuencia de proteína de IL-7 madura. Se ensayó el plegamiento de la huFcγ1-IL-7 mediante la determinación de la pauta de los enlaces de disulfuro presentes en la mitad IL-7 de la proteína de fusión. En resumen, se generaron mapas peptídicos de la huFcγ1-IL-7 a partir de material tratado con tripsina y se analizó con respecto a la presencia de fragmentos peptídicos característicos. La proteína huFcγ1-IL-7 se trató con tripsina bien en una forma nativa o tras reducción y alquilación. Para contabilizar los fragmentos peptídicos que pueden estar glicosilados, se trataron adicionalmente muestras de las proteínas naturales y desnaturalizadas con PNGasaF para eliminar las cadenas de glicosilo como paso previo a la digestión tripsínica. Los fragmentos peptídicos se fraccionaron mediante HPLC y se determinó su masa mediante espectroscopia de masas.

En el contexto de Fcγ1-IL-7, un fragmento peptídico, que contiene el enlace de disulfuro Cys47-Cys141 (“3-6”) tendría una masa de 1.447,6, mientras que un fragmento peptídico, que contiene el enlace disulfuro Cys2-Cys141 (“1-6”) tendría una masa de 1.426,6. De manera similar, un fragmento peptídico, que contiene el enlace de disulfuro Cys34-Cys129 (“2-5”) tendría una masa de 2.738,3. En realidad, los fragmentos peptídico con una masa de 1.447,6 (“3-6”) y de 2.738,3 (“2-5”) fueron identificados en muestras derivadas de la proteína Fc-IL-7 independientemente de que las muestras hubieran sido tratadas con PNGasaF o no, pero no se detectaron en muestras procedentes de Fc-IL-7. A la inversa, el fragmento peptídico con una masa de 1.426,6 (“1-6”) no se encontró en ninguna de las muestras. De este modo, la Fcγ1-IL-7 contenía los enlaces disulfuro Cys47-Cys141 y Cys34-Cys129, pero no Cys2-Cys141. Se observó que un fragmento peptídico de la masa prevista de 2.439,2, que corresponde al fragmento que contiene Cys2-Cys92 (“1-4”) únicamente fue identificado en la muestra procedente de la proteína de fusión nativa tratada con PNGasaF. En efecto, la Cys92 yace dentro del motivo tripéptido Asn91Cys92Thr93, lo que indica que Asn91 estaba glicosilada en la huFcγ1-IL-7. De este modo, la pauta de enlace de disulfuro en huFcγ1-IL-7 era consistente con Cys2-Cys92, Cys34-Cys129 y Cys47-Cys141. Esta configuración de los enlaces de disulfuro de la Fc-IL-7, determinada de manera experimental, se encuentra en contraste con la configuración experimentalmente determinada descrita para la IL-7 producida por vía bacteriana y replegada IL-7 (Cosenza *et al.* (1997) JBC 272:32995).

Locus de glicosilación N-ligados

La IL-7 humana contiene tres locus de glicosilación potenciales, en las posiciones Asn70, Asn91 y Asn116 de la secuencia proteica de IL-7 madura. Se analizaron los mapas peptídico de la huFcγ1-IL-7 (reducida/alquilada) con respecto a la presencia de fragmentos peptídicos característicos. En estado glicosilado, estos fragmentos característicos serían relevantes únicamente en las muestras tratadas con PNGasaF. Para los fragmentos peptídicos tripsínicos, que contienen residuos no modificados estarían previstas masas de 1.489,7, de 1.719,9 y de 718,3 para Asn70, Asn91 y Asn116, respectivamente.

Se identificaron, en efecto, fragmentos peptídicos con una masa de 1.489,7 y de 1.719,9 en muestras que habían sido tratadas con PNGasaF, pero estaban ausentes en las muestras no tratadas, lo que indica que Asn70 (contenida en la secuencia...MNSTG...) (SEQ ID NO:31) y Asn91 (contenida en la secuencia...LNCTG...) (SEQ ID NO:32), estaban realmente glicosiladas. De manera sorprendente, se identificó un fragmento tripsínico con una masa de 718,3, lo que corresponde a SLEENK (SEQ ID NO:35), tanto en la muestra tratada con PNGasaF como en la muestra no tratada, lo que indica que Asn116 no estaba glicosilada. Esto no era de esperar puesto que la Asn116 en la secuencia

ES 2 305 886 T3

de IL-7 humana ...PTKSLEENKSLKE ... (SEQ ID NO: 13) (véase SEQ ID NO:1) se ha pronosticado como locus de glicosilación N-ligado. El locus de glicosilación putativo NKS está conservado en corderos y en terneras así como en seres humanos.

- 5 El análisis de las pautas de enlace de disulfuro y los locus de glicosilación N-ligados, repetidos con muestras de Fc γ 1-(ligando1)-IL-7 y de Fc γ 2h(FN>AQ)-IL-7 dan resultados similares.

Ejemplo 4

10 *Procedimientos ELISA*

Se determinaron las concentraciones de los productos proteicos en los sobrenadantes de clones MTX resistentes y de otras muestras ensayadas mediante el anti-huFc ELISA, como se ha descrito con detalle más adelante. Se revistieron placas ELISA con AffiniPure Goat anti-IgG humana (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) a 5 μ g/mL en PBS, y 100 μ L/pocillo en placas de 96 pocillos. Las placas revestidas se cubrieron y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con Tween al 0,05% (Tween 20) en PBS y se bloquearon con BSA al 1%/suero de cabra al 1% en PBS, 200 μ L/pocillo. Tras incubación con el tampón de bloqueo a 37°C durante 2 horas, se lavaron las placas 4 veces con Tween al 0,05% en PBS y se troquelaron en seco. Las muestras se diluyeron convenientemente en tampón de muestra (BSA al 1%/suero de cabra al 1%/Tween al 0,05% en PBS). Se preparó una curva patrón empleándose un anticuerpo quimérico (con una Fc humana) de concentración conocida. Para preparar una curva patrón, se realizaron diluciones en serie en el tampón muestra para proporcionar una curva patrón que va desde 125 ng/mL hasta 3,9 ng/mL. Las muestras diluidas y los patrones se añadieron a la placa, 100 μ L/pocillo y se la placa se incubó a 37°C durante 2 horas. Tras la incubación, se lavó la placa 8 veces con Tween al 0,05% en PBS. Se añadieron a cada pocillo 100 μ L del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante anti-IgG humana, diluido hasta aproximadamente 1:120,000 en el tampón muestra. La dilución exacta del anticuerpo secundario se determinó en cada lote de la HRP-conjugado anti-IgG humana. La placa se lavó, tras incubación a 37°C durante 2 horas, 8 veces con Tween al 0,05% en PBS.

Se añadieron a la placa 100 μ L/pocillo de solución de sustrato. La solución se preparó por disolución de 30 mg de OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina (OPD), (1 tableta) en 15 mL de tampón de ácido cítrico 0,025 M/Na₂HPO₄ 0,05 M, pH 5, que contenía un 0,03% de peróxido de hidrógeno recién añadido. Se reveló el color durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 4N, 100 μ L/pocillo. La placa se leyó mediante un lector de placas, que estaba ajustado a 490 y a 650 nm y programado para restar la densidad óptica (OD) del fondo a 650 nm de la densidad óptica (OD) a 490 nm.

35 La concentración de la IL-7 humana en muestras de suero de animales tratados con proteínas de fusión de huFc-IL-7 o con IL-7 humana recombinante se determinó mediante ELISA, esencialmente como se ha descrito precedentemente. La IL-7 humana se obtuvo a través de un anticuerpo anti-IL-7 humana de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se detectó con un anticuerpo de biotina de cabra anti-IL-7 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN).

40 Ejemplo 5

Purificación de las proteínas huFc-IL-7

Se llevó a cabo una purificación patrón de las proteínas de fusión que contienen Fc basada en la afinidad de la mitad proteica Fc para la proteína A. En resumen, se cultivaron células NS/0 que expresan la proteína de fusión apropiada, en medio de cultivo tisular y se recogió el sobrenadante, que contiene la proteína expresada, y se cargó en una columna preequilibrada de flujo rápido Fast Flow Protein A Sepharose. A continuación se lavó extensamente la columna con tampón (tal como fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH neutro). La proteína ligada se eluyó a pH bajo (pH 2,5-3) en el mismo tampón que precedentemente y las fracciones se neutralizaron inmediatamente.

50 Con el fin de obtener una preparación de proteína de fusión de huFc-IL-7 no agregada (aproximadamente un 98% de monómero), se cargó el eluato en una columna preparativa SEC (Superdex) y se recogió la fracción del pico monómero. De manera típica, la concentración de la proteína recuperada fue aproximadamente de 0,5 mg/ml hasta 2 mg/ml, y se concentró la muestra, en caso dado, mediante diálisis por centrifugación (por ejemplo Viva Spin con una retención para un peso molecular de 30 kDa).

Ejemplo 6

Actividad en in vitro de las proteínas huFc-IL-7

60 La actividad citoquina de las proteínas de fusión de huFc-IL-7 purificadas se determinó *in vitro* en un bioensayo de proliferación celular. Se activaron PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica -Peripheral Blood Mononuclear Cells-) mediante PHA-P para producir células que respondan a la IL-7. La proliferación se midió en un ensayo patrón de incorporación de timidina. En resumen, en primer lugar se incubaron las PBMC durante cinco días con 10 microgramos/ml de PHA-P, las células se lavaron y a continuación se incubaron en un medio suplementado con proteínas de fusión de huFc-IL-7, en una serie de diluciones, durante un total de 48 horas. Durante las 12 horas finales, las muestras se sometieron a impulsos con 0,3 μ Ci de [metil-3H]timidina (Dupont-NEN-027). A continuación se lavaron las células extensamente, se recogieron y se lisaron sobre filtros de vidrio. Se midió la 3H-timidina incorporada en el

ES 2 305 886 T3

ADN en un contador de escintilaciones. Se ensayó como patrón la proteína huIL-7 de tipo silvestre, obtenida de la firma R&D Systems (Minneapolis, MN), u obtenida del National Institute for Biological Standards y Control (NIBSC).

Se obtuvo un valor ED50 de la proliferación celular para las proteínas de fusión de huFc-IL-7 a partir del trazado de una curva de respuesta a la dosis según las técnicas normalizadas, y se determinó la concentración proteica que da como resultado la respuesta semimáxima. Se evaluaron las proteínas de fusión de huFc γ 1-IL-7, huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 y huFc γ 1(ligando1)-IL-7. Los valores ED50 de las proteínas de fusión eran claramente similares entre sí, disminuyendo en un múltiplo de 3 de uno a otro. Por lo tanto, se ha encontrado que estas alteraciones en la mitad Fc tenían poca influencia sobre la actividad IL-7 de la proteína de fusión.

De igual modo, se ha encontrado que los valores ED50 de estas proteínas de fusión eran aproximadamente entre 3 y 10 veces mayores que el valor ED50 obtenido para la huIL-7 comercialmente obtenible en la firma R&D Systems. Puesto que esta preparación comercial se produce en bacterias y no está glicosilada, se evaluó la proteína huFc γ 1-IL-7 desglicosilada por vía enzimática, mediante el tratamiento con PNGasaF. Se ha encontrado que tenía una actividad similar a la forma no tratada. Sin pretender establecer cualquier límite teórico, la actividad de las proteínas de fusión, que se encuentra disminuida de algún modo, podría deberse, no a la glicosilación de la mitad IL-7 sino, en su lugar, a un efecto estérico resultante del extremo N restringido de la mitad IL-7.

Ejemplo 7

Farmacocinética de las proteínas huFc-IL-7

Se evaluaron los perfiles farmacocinéticos (PK) de una proteína de fusión de huFc-IL-7 y de IL-7 humana recombinante (Peptotech, Rocky Hill, NJ) y los resultados se han representado en la figura 13. Se administró una inyección subcutánea única de cantidades equimolares de huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 o de IL-7 humana recombinante (50 microgramos) a grupos de ratones C57BL6/J. Se obtuvieron muestras de sangre mediante sangrado retroorbital en el momento de la inyección (*es decir* en el instante $t = 0$ minutos), y al cabo de 30 minutos, de 1 hora, de 2 horas, de 4 horas, de 8 horas, de 24, de 48, de 72, de 96, de 120 y de 144 horas después de la inyección. Se recogieron muestras en tubos de heparina para evitar la coagulación, y se eliminaron las células por centrifugación en la microcentrifugadora de Eppendorf de alta velocidad durante 4 minutos a 12,500 g. Se calcularon los valores PK con el paquete de programas de ordenador PK solutions 2.0TM (Summit Research Services, Montrose, CO).

Se determinó la concentración de la IL-7 administrada en muestras de plasma por cuadruplicado en cada intervalo de tiempo mediante un ELISA específico para la IL-7 humana. Se encontró que el comportamiento farmacocinético de la huFc-IL-7 y de la IL-7 recombinante presentaban una notable diferencia. Para la IL-7 humana recombinante, la concentración máxima (C_{max}) fue de 23,5 ng/ml al cabo de 2,0 horas desde la inyección (T_{max}), mientras que para la huFc-IL-7 la C_{max} fue de 1.588,7 ng/ml al cabo de 24 horas desde la inyección. De igual modo, mientras que la IL-7 humana recombinante fue absorbida más rápidamente que la huFc-IL-7 (vida media de la fase β 0,9 horas frente a 12,4 horas), la huFc-IL-7 fue eliminada aproximadamente 9 veces más despacio de la circulación durante la fase β . De este modo, en términos de AUC (área bajo la curva) como medida de la exposición total al fármaco, los ratones que recibieron huFc-IL-7 tenían una exposición 572 veces mayor a la proteína administrada que los ratones que recibieron IL-7 humana recombinante. Estos datos demuestran una mejora significativa de las proteínas de fusión de huFc-IL-7 con relación a la IL-7 humana recombinante libre, con respecto a su PK. De igual modo, se encontró que eran similares entre sí los perfiles PK de las proteínas de fusión de huFc-IL-7, tales como huFc γ 1-IL-7 y huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7, huFc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7 y huFc γ 1(YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7, que se administraron a los ratones mediante inyección intravenosa.

Ejemplo 8

Eficacia de la huFc-IL-7 en ratones linfopénicos después del trasplante de médula ósea (BM)

Se evaluó *in vivo* la eficacia de las proteínas de fusión de huFc-IL-7 en comparación con la IL-7 humana recombinante. A título de ejemplo se administraron a ratones linfopénicos, después del trasplante de médula ósea (BM) empobrecida en células T, la huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 o la IL-7 humana recombinante (Peptotech, Rocky Hill, New Jersey) y se evaluó la recuperación de las poblaciones de células inmunes.

De manera esencial, los ratones receptores fueron irradiados letalmente como paso previo al trasplante BM, con dos dosis de 600 cGy, en todo el cuerpo, mediante irradiación en intervalos de 4 horas, y las células BM, resuspendidas en PBS, se infundieron en las venas de la cola de los ratones receptores. Se administró por vía subcutánea a los ratones receptores a intervalos regulares, a partir del quinto día, una cantidad equimolar de la huFc-IL-7 (7 μ g) o de la IL-7 humana recombinante (2,5 μ g) (Peptotech, Rocky Hill, NJ). Durante el transcurso del experimento, se tomaron muestras de sangre del ratón receptor y se midieron en las muestras las concentraciones celulares de linfocitos.

Se obtuvieron células BM, para trasplantes celulares BM, de manera aséptica a partir de los fémures y de las tibias de ratones BL/6.SJL (H2^b, CD45.1) (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) y se empobrecieron en células T mediante la eliminación por vía magnética de células T marcadas sobre columnas MACS[®] (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). El grado de empobrecimiento de las células T se monitorizó por análisis FACS con anticuerpos marcados por fluorescencia frente a CD45, $\alpha\beta$ -TCR (células T) y 7-aminoactinomicina D (7-AAD, células apoptóticas) (Calbiochem, X). Se emplearon 10 x 10⁶ células BM vivas (7-AAD-negativas) (que contenían menos de un 1% de células T) por ratón

ES 2 305 886 T3

receptor. En el caso de los trasplantes BM congénicos, se emplearon ratones B6 (H2^b, CD45.2) como la hebra de ratón receptor, y en los trasplantes BM alogénicos se eligieron ratones B6C3F1 (H2^{b/k}, CD45.2).

5 Se midieron las concentraciones de las células de linfocitos (como se ha representado en la tabla 1) esencialmente como se ha descrito por Brocklebank y Sparrow (Brocklebank y Sparrow (2001) Cytometry 46:254). En resumen, se disolvieron cuentas fluorescentes (TruCOUNT™ Tubes, BD Biosciences, San Jose, CA) en 40 μ l de PBS que contenían una mezcla de anticuerpos específicos de linfocitos. A continuación se añadieron 10 μ l de la sangre anti-coagulada, se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células de los linfocitos se lisaron en 450 μ l de solución de lisis Red Blood Cell (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron 10 muestras mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, CA). La concentración de una población particular de linfocitos (*por ejemplo* células B, células T o leucocitos totales) se determinó por creación de regulaciones separadas vía linfocitos y de cuentas fluorescentes y mediante la lectura del número de los episodios en cada regulación. El número de linfocitos regulados por microlitro se calculó dividiendo el número de episodios en una región linfocítica regulada entre el número de episodios en la región de perla regulada. Este número se multiplicó por 15 la fracción del número de perlas por cada tubo TruCOUNT™ (proporcionado por el suministrador) sobre el volumen de la muestra y multiplicado, finalmente, por el factor de dilución de la muestra.

En un experimento se evaluó la reconstitución de los linfocitos en cuadro de trasplante BM congénico, empleándose los materiales y los métodos que han sido indicados precedentemente. Los ratones receptores fueron inyectados con huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 a una dosis de 7 μ g (125 μ g de IL-7/kg de peso corporal) y se midieron las células de linfocitos como se ha descrito. Se detectaron linfocitos donantes como células positivas CD45.1, mientras que los linfocitos endógenos de los ratones receptores se detectaron como células positivas CD45.2. Las células B y las células T de los linfocitos se identificaron empleándose, respectivamente, marcadores de linfocitos B220 y CD3. Se encontró que el día 49, los linfocitos donantes (células positivas CD45.1) habían repoblado los ratones receptores a un nivel comparable con el de los ratones de control no irradiados, mientras que los linfocitos endógenos (células positivas CD45.2) no se habían expandido de manera significativa. Además, el tratamiento con la proteína de fusión de huFc-IL-7 no provocó una toxicidad significativa. Estos resultados demostraron la eficacia de la proteína de fusión en la expansión de poblaciones de linfocitos transferidas de manera adoptiva. Los resultados se han representado en la figura 16.

En otro experimento, se empleó un modelo de trasplante BM alogénico, que puede simular mejor un cuadro de trasplante clínico, para comparar una proteína de fusión de huFc-IL-7 con la IL-7 humana recombinante, y los resultados se han mostrado en la tabla 1. De igual modo, se emplearon los métodos y los materiales descritos precedentemente. Se administraron la huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7 y la IL-7 humana (equivalente de 125 μ g IL-7/kg de peso corporal) bien un día sí y otro no (q2d) o una vez la semana (q7d) desde el quinto día hasta el día 56 desde el trasplante. Como 35 controles sirvieron ratones donantes tratados PBS y ratones irradiados, receptores de médula ósea tratados con PBS.

Las células B (CD45.1⁺, B220⁺, CD19⁺), derivadas del donante, alcanzaron en los ratones receptores, tratados con la proteína de fusión, los niveles de la línea de base (como se ha definido por la concentración en sangre de las células B en los ratones de control donantes) al cabo de 14 o de 16 días después del trasplante, cuando se administraron 40 respectivamente q2d o q7d. Por el contrario, en ratones receptores, tratados con la IL-7 humana recombinante, no tiene efecto ninguno de los regímenes de dosificación; se requirió en los ratones receptores tratados con PBS y en los ratones receptores tratados con la IL-7 humana aproximadamente el mismo tiempo para que el número de células B alcanzase el nivel de la línea de base, aproximadamente 28 días. Además de la reconstitución acelerada de las células B, el tratamiento con la huFc-IL-7 favorece la expansión continua de las células B hasta el día 33: el q2d administrado a la huFc-IL-7 dio como resultado un incremento 7 veces mayor, mientras que el q7d administrado dio como resultado 45 un incremento de 2,5 veces en el número de células B en comparación con los ratones de control. Después del día 33, disminuyó el número de células B, pero todavía se encontraban aproximadamente en un número 2 veces mayor que en los ratones de control. Por lo tanto, después del día 33, disminuyen en la sangre los niveles de la proteína de IL-7 administrada, lo que podría deberse, en parte, a la formación de anticuerpos de neutralización de la proteína de fusión humana. La figura 14 representa estos resultados de la reconstitución de las células B en ratones irradiados, 50 trasplantados con médula ósea, tratados con la IL-6 humana recombinante y con la huFc-IL-7.

Se observó un resultado similar con respecto a las células T derivadas del donante (CD45.1⁺, CD3⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺). El tratamiento con la proteína de fusión de huFc-IL-7 dio como resultado la reconstitución acelerada de las células T, mientras que el tratamiento con la IL-7 humana recombinante no lo produjo. Los niveles máximos en células T se alcanzaron aproximadamente el día 49. Sin embargo, únicamente se alcanzaron números de células T por encima de la línea de base (*es decir* la concentración en sangre de las células T en los ratones donantes) con un plan de dosificación de q2d de la proteína de fusión de huFc-IL-7, que alcanza aproximadamente 1,5 veces el número de las células T en los ratones de control. La figura 15 representa estos resultados de reconstitución de las células T en ratones irradiados 60 trasplantados con médula ósea tratados con la IL-7 humana recombinante y con la huFc-IL-7.

Independientemente del número pasajeramente elevado de células B y de células T donantes en los ratones receptores bajo ciertas condiciones, ninguno de los ratones experimentales mostró cualquier signo de morbilidad durante el transcurso del experimento. Los análisis realizados en órganos internos el día 55 no mostraron deformaciones patológicas en el hígado, en el riñón, en el pulmón, en el bazo, en el timo, en los ganglios linfáticos, en el estómago, en 65 el intestino delgado ni en el colon. De este modo, este experimento de trasplante alogénico demuestra que la proteína de fusión de huFc-IL-7 tenía un poder de reconstitución de los linfocitos *in vivo* significativamente mayor que la IL-7 humana recombinante, tras acondicionado mieloablativo.

Tabla 1: Efecto de la proteína de fusión de huFc-IL-7 sobre la reconstrucción de las células inmunes.

		Número de células por microlitro de sangre									
Tratamiento		Día									
		7	13	19	27	33	41	47	55		
I. Donante derivado											
Leucocitos (CD45.1*)											
a.)	BMT alógeno en el ratón B6C3	PBS	AVG 580,8	3576,8	4384,0	16805,6	20732,8	16395,2	21462,4	20329,6	
			SEM 324,5	1717,0	1474,2	8367,6	10065,3	7997,3	11230,2	9693,2	
		huFc-IL-7, q2d	AVG 248,8	26597,0	130253,6	148048,0	194266,4	168794,0	127848,0	79175,2	
			SEM 89,3	4786,2	25106,8	18786,3	17131,1	25949,9	981,0	10740,2	
		huFc-IL-7, q7d	AVG 278,4	5848,8	32308,0	64256,0	74103,2	69042,4	55989,6	58519,2	
			SEM 106,3	762,9	2786,3	6081,4	8345,9	14497,4	5989,8	6583,8	
		IL-7 humana, q7d	AVG 270,7	6020,0	6922,7	24278,7	37353,3	42166,7	33570,7	38138,7	
			SEM 84,9	1229,2	1089,7	5235,3	2697,0	4691,4	764,5	3273,6	
		IL-7 humana, q7d	AVG 229,0	4603,0	4963,0	27443,0	27027,0	27797,0	32675,0	33205,0	
			SEM 31,9	435,6	654,1	2513,8	1813,4	4084,6	6307,8	4894,7	
b.) Ratón de control B6.SJL											
		PBS	AVG 30744,5								
			SEM 3018,6								

Número de células por microlitro de sangre											
Tratamiento		Día									
		7	13	19	27	33	41	47	55		
II. Donante derivado células B (CD45.1 ⁺ CD19 ⁺ B220 ⁺)											
a.) BMT alógeno en el ratón B6C3	PBS	AVG 32,0	1013,3	4257,3	19294,7	22549,3	17842,7	23841,3	22296,0		
		SEM 5,7	25,7	661,1	2858,5	2625,4	1691,6	3783,7	1474,5		
	huFc-IL-7, q2d	AVG 16,0	17830,0	122122,4	131862,4	169745,6	142972,0	98571,0	58661,6		
		SEM 5,7	3755,4	24028,4	16974,5	15413,6	22834,6	2599,1	9352,9		
	huFc-IL-7, q7d	AVG 14,4	2559,0	28124,0	53573,6	59999,2	52932,8	41489,6	42899,2		
		SEM 6,5	408,9	2464,1	4911,5	6337,2	10998,2	4821,1	5013,0		
	IL-7 humana, q7d	AVG 5,3	1550,7	4316,0	17802,7	28061,3	30177,3	24720,0	26104,0		
		SEM 3,5	403,5	542,7	3689,5	1484,5	2861,6	633,8	2085,3		
	IL-7 humana, q7d	AVG 4,0	748,0	3179,0	19303,0	19203,0	17930,0	22460,0	21473,0		
		SEM 1,6	56,1	443,3	1666,1	1429,5	2511,6	4458,6	3199,5		
b.) Ratón de control B6.SJL	PBS	AVG 15572,6									
		SEM 1631,4									

Número de células por microlitro de sangre												
	Tratamiento		7	13	19	27	33	41	47	55	Día	
III. Donante derivado células T (CD45.1 ⁺ CD3 ⁺ abTCR ⁺)												
a.) BMT alogénico en el ratón B6C3	PBS	AVG	0,0	206,7	192,0	1808,0	3928,0	4453,3	6178,7	5622,7		
		SEM	0,0	121,6	46,2	245,0	546,7	533,0	538,1	210,0		
	huFc-IL-7, q2d	AVG	0,0	124,0	839,0	5260,8	12252,8	15204,8	16628,0	13365,6		
		SEM	0,0	24,9	155,5	1183,1	1734,8	1641,2	1524,5	1423,9		
	huFc-IL-7, q7d	AVG	0,0	38,4	228,0	2428,0	5492,0	9988,0	9252,8	8598,4		
		SEM	0,0	6,1	38,5	326,2	918,1	2475,8	2748,6	1185,9		
	IL-7 humana, q7d	AVG	0,0	56,0	144,0	1057,3	3068,0	5368,0	5081,3	7112,0		
		SEM	0,0	3,3	42,5	160,1	154,0	645,5	113,7	409,9		
	IL-7 humana, q7d	AVG	0,0	41,0	88,0	1493,0	2579,0	3918,0	5021,0	6043,0		
		SEM	0,0	2,5	20,2	187,5	238,0	694,6	724,2	1013,1		
b.) Ratón de control B6.SJL	PBS	AVG	10832,0									
		SEM	1500,4									

Ejemplo 9

Eficacia de la huFc-IL-7 en los trasplantes de células T en ratones linfopénicos

5 La eficacia de las proteínas de fusión de huFc-IL-7 se evaluó igualmente en un modelo de trasplante de células T. En esencia, se transfirió una población (clonal) homogénea de células T en ratones irradiados, inmunodeficientes, administrándose a los ratones receptores la proteína de fusión de huFc-IL-7, y se evaluó el grado de reconstitución de las células T y, eventualmente, la función de las células T.

10 Para obtener una población homogénea de células T, se tomaron esplenocitos de ratones P14 TCR-tg/RAG (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), que estaban desprovistos de células B. De igual modo, todas las células T de estos ratones expresan el receptor transgénico de las células T (TCR), P14, que es específico del epítipo vírico (gp33 de LCMV).

15 Se inyectaron, por vía intravenosa, suspensiones de células individuales de esplenocitos en la cola de ratones inmunodeficientes RAG C γ + (Charles River Laboratories) que habían sido irradiados una vez con 650 radianes (dosis subletal) 4 horas antes del trasplante. Se administraron a los ratones receptores en días alternos, comenzándose en el día 2,7 μ g de la proteína de fusión de huFc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7. Se administró PBS a un grupo de control de ratones receptores. El grado de reconstitución de las células T como respuesta a la proteína de fusión de huFc-IL-7 o al PBS se determinó por medida de la presencia de células T P14 (células CD8⁺V β 8.1⁺V α 2⁺) en la sangre mediante citometría de flujo.

20 Se encontró que los ratones, a los que se había administrado la proteína de fusión de huFc-IL-7, tenían el día 35 un aumento de 17 veces en el número de células T (35,000 células/ μ l), en comparación con los ratones de control (2,000 células/ μ l). Es evidente que los niveles de reconstitución de las células T exceden a aquellos que pueden observarse en los ratones P14 TCR no tratados (23,000 células/ μ l). De igual modo, en estos ratones tratados con la huFc-IL-7, una fracción significativa de las células T reconstituidas ha aumentado la regulación de la subunidad receptora IL-2R α , CD25, en la superficie celular. De este modo, no solamente la proteína de fusión de huFc-IL-7 era conveniente para expandir las células T trasplantadas, sino que también puede haber preacondicionado a las células T transferidas para que respondan a las citoquinas, tal como la IL-2.

Ejemplo 10

Terapia adyuvante con la huFc-IL-7 para pacientes inmunocomprometidos

35 Se han considerado numerosos cuadros clínicos en los cuales pueden beneficiarse los pacientes de la terapia adyuvante con la huFc-IL-7. Por ejemplo, se han desarrollado nuevas modalidades de tratamiento para pacientes en pediatría con enfermedades malignas tales como leucemias linfoblásticas o mieloides en los que, como consecuencia de una terapia mieloablativa, son tratados mediante el trasplante de células madre hematopoiéticas alogénicas para reconstituir el sistema inmune.

40 Para incrementar de manera notable el grupo de donantes potenciales para estos pacientes, se ha encontrado que el G-CSF de células madre movilizadas de sangre periférica (PBSCs) procedentes de donantes no emparentados compatibles o de donantes haploidénticos con 1 - 3 locus HLA no compatibles, pueden ser una fuente de células a condición de que el trasplante esté empobrecido en células T (véase Handgretinger *et al.* (2001) *Annals NY Acad. Sciences* 938:340-357). Este empobrecimiento reduce drásticamente la aparición de un rechazo agudo de trasplante entre el injerto y el huésped (GvHD); sin embargo, se cree que debido a la baja concentración de las células T, existía un significativo retardo en la inmunorreconstitución. Los pacientes estaban sometidos a un alto riesgo de infecciones víricas durante, al menos, un período de 6 meses después del trasplante, y las células T no retornaban a los niveles normales durante un año (Handgretinger *et al.*, (2001) *Annals NY Acad. Sciences* 938:340-357; Lang *et al.*, (2003) *Blood* 101:1630-6). Por lo tanto, sería ventajoso incrementar la tasa de repoblación de las células T y de las otras células inmunes en estos pacientes.

55 Los pacientes, que pueden beneficiarse de la terapia con la huFc-IL-7, incluyen pacientes con leucemia infantil, tal como una leucemia linfoblástica o una leucemia mieloide. Los niños, que tienen este desorden, serán sometidos, en primer lugar, a una terapia para el acondicionamiento mieloablativo, que puede estar basada bien en el agente quimioterapéutico constituido por el busulfan o mediante irradiación de todo el cuerpo, combinada con quimioterapia. A título de ejemplo, de conformidad con el diagnóstico y la edad del paciente, el paciente es tratado con irradiación en todo el cuerpo (de manera típica 6 tratamientos de 2 Gy cada uno), globulina anti-timocito de conejo (10 mg/kg por día durante 3 días), etopósido (40 mg/kg) y ciclofosfamida (120 mg/kg).

60 Para obtener células madre CCD34 positivas (pos) para el trasplante, se movilizan células madre de la sangre periférica (PBSCs) de un donante histocompatible (alógeno) con una dosis diaria de 10 microgramos/kg de G-CSF durante 6 días y se recogen mediante leucofairesis el quinto y el sexto día. De manera general, se obtienen aproximadamente 20 x 10⁶/kg de células madre CD34 pos y son trasplantadas. Las células madre CD34 pos son purificadas a partir de las PBSC mediante selección positiva con un anticuerpo antiCD34 en un sistema SuperMACS (Magnetic activated cell sorting, Miltenyi Biotec) y son eluidas. El empobrecimiento en células T se encuentra comprendido aproximadamente entre 5 unidades logarítmicas hasta aproximadamente 10 x 10³ células/kg. Los agregados y otros desechos son

ES 2 305 886 T3

excluidos del injerto mediante clasificación FACS. La suspensión celular es infundida en el paciente a través de un catéter venoso central. De manera opcional, el injerto puede incluir poblaciones purificadas de otras células inmunes, tales como las células NK heploidénticas, DCs, monocitos así como también células madre CD34neg.

5 Para evaluar el injerto se lleva a cabo un recuento neutrófilo absoluto. Se considera que el injerto ha tenido éxito una vez que los niveles neutrófilos permanezcan por debajo de 50 células/microlitro. La reconstitución de las células inmunes se monitoriza mediante análisis FACS, inicialmente una vez a la semana, y cada tres meses una vez que se haya iniciado la recuperación de las células T.

10 Para aumentar la inmunorreconstitución, el paciente se trata con una proteína de fusión de huFc-IL-7 tal como la huFc γ 2h(FN>AQ)-IL-7 o la huFc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7. Aproximadamente 3 semanas después del trasplante (o una vez que se haya establecido el trasplante), el paciente recibe una administración subcutánea de la huFc γ 2h (FN>AQ)-IL-7 o de la huFc γ 1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7 a una dosis aproximada de 1,5 mg/m² (o a una dosis en el intervalo comprendido entre 0,15 mg/m² y 15 mg/m²), aproximadamente 2 veces a la semana durante 6 meses hasta 12
15 meses, hasta que el recuento de las células T alcance el 50% de los niveles normales. Se ha encontrado que se mejora el pronóstico del paciente debido al menor riesgo de infección vírica, que es una de las complicaciones principales después de un trasplante. De igual modo se ha encontrado que este tratamiento no aumenta de manera significativa el riesgo de una GvHD aguda.

20 Además de la administración de la proteína de huFc-IL-7, se administran, de manera óptima, otros medicamentos con fines profilácticos. Éstos incluyen, por ejemplo, el aciclovir, el metronidazol, el flucanazol y el co-trimoxazol. Durante los tres primeros meses, el paciente puede recibir una administración semanal de inmunoglobulinas, así como de G-CSF.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una proteína de fusión de IL-7 que comprende una cadena de inmunoglobulina y una molécula de IL-7, que está modificada en comparación con la IL-7 de tipo silvestre, ligada directamente o a través de una molécula ligante, en la que la modificación en la IL-7 consiste:

(i) en que los residuos de aminoácido en las posiciones 70 y 91 están glicosilados y el residuo de aminoácido en la posición 116 no está glicosilado; o

10 (ii) en que existen enlaces de disulfuro dentro de la mitad IL-7 entre Cys2 y Cys92, entre Cys34 y Cys129 y entre Cys47 y Cys141,

15 con la condición de que, cuando la modificación en la IL-7 corresponda a (ii) estará excluida una proteína de fusión de IL-7, en la que dicha molécula de IL-7 esté funcionalmente ligada con una porción Fc de una cadena pesada de IgG a través de una región bisagra peptídica.

20 2. Una proteína de fusión de IL-7 que comprende una cadena de inmunoglobulina y una molécula de IL-7, que está modificada en comparación con la IL-7 de tipo silvestre, ligada directamente o a través de una molécula ligante, en la que la modificación en la IL-7 consiste:

(i) en que los residuos de aminoácido en las posiciones 70 y 91 están glicosilados y el residuo de aminoácido en la posición 116 no está glicosilado; y

25 (ii) en que existen enlaces de disulfuro dentro de la mitad IL-7 entre Cys2 y Cys92, entre Cys34 y Cys129 y entre Cys47 y Cys141.

30 3. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 1 o 2, en la que el residuo de aminoácido en la posición 116 es asparagina.

4. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 1 o 2, en la que el residuo de aminoácido en la posición 116 no está glicosilado.

35 5. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 1 o 2, en la que el residuo de aminoácido en la posición 116 está modificado de tal manera que no es adecuado como locus para una glicosilación.

6. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 1 o 2, en la que 1 molécula de IL-7 comprende una eliminación.

40 7. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 6, en la que la IL-7 troncada comprende una eliminación de dieciocho aminoácidos desde el aminoácido 96 hasta el aminoácido 114 de la SEQ ID NO: 1.

8. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 1 o 2, en la que la molécula de IL-7 es la IL-7 humana.

45 9. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 1 o 2, en la que la IL-7 es una mitad de IL-7 madura.

10. Una proteína de fusión de IL-7 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la cadena de inmunoglobulina comprende, al menos, una porción de un dominio constante.

50 11. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 10, en la que el dominio constante se elige entre el grupo que comprende CH1, CH2 y CH3.

12. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 10 o 11, en la que el dominio constante es un dominio constante de IgG1.

55 13. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 12, en la que está modificado el dominio constante Asn297 de la IgG1.

14. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 13, en la que la modificación de Asn297 es Asn297Gln.

60 15. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 13, que comprende además una modificación en Tyr296.

16. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 15, en la que la modificación Tyr296 es Tyr296Ala.

65 17. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 10 o 11, en la que el dominio constante es un dominio constante de la IgG2.

ES 2 305 886 T3

18. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 17, en la que cadena de IgG2 comprende una bisagra de IgG1.

5 19. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 17 o 18, en la que está modificado el dominio constante Asn297 de la IgG2.

20. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 19, en la que la modificación de Asn297 es Asn297Gln.

10 21. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 19, que comprende, además, una modificación en Phe296.

22. Una proteína de fusión de IL-7 de la reivindicación 21, en la que la modificación Phe296 es Phe296Ala.

15 23. Una proteína de fusión de IL-7 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la mitad IL-7 de la proteína de fusión tiene una actividad biológica incrementada en comparación con la IL-7 de tipo salvaje.

24. Una molécula de ADN aislada que codifica una proteína de fusión de IL-7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

20 25. Una célula huésped cultivada que comprende el ADN de la reivindicación 24.

26. Un procedimiento para la preparación de una proteína de fusión que comprende: la transformación de una célula huésped con el ADN de la reivindicación 24, el cultivo de la célula huésped, y la expresión y la recolección de la proteína de fusión de IL-7.

25 27. Una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento de desórdenes inmunes o del cáncer, que comprende una proteína de fusión de IL-7 en una cantidad farmacéuticamente efectiva de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, opcionalmente junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

30 28. Uso de una proteína de fusión de IL-7 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de deficiencias inmunes y del cáncer.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

IL-7 humana

MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNC
LNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCT
GQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLQEIKTCWNKILMGTKEH

(SEQ ID NO:1)

Figura 2

IL-7 de ternera

MFHVSFRYIFGIPPLILVLLPVASSDCDISGRDGGAYQNVLMVNIDDLNMINFDSNCL
NNEPNFFKKHSCDDNKEASFLNRASRKLQFLKMNISDDFKLHLSTVSQGTLTLLNCTS
KKGKGRKPPSLSEAQPTKNLEENKSSREQKKQNDLCFLKILLQKIK TCWNKILRGIKEH

(SEQ ID NO:2)

Figura 3

IL-7 de cordero

MFHVSFRYIFGIPPLILVLLPVASSDCDFSGKDGAYQNVLMVSIDDLNMINFDSNCL
NNEPNFFKKHSCDDNKEASFLNRAARKLKQFLKMNISDDFKLHLSTVSQGTLTLLNCTS
KKGKGRKPPSLGEAQPTKNLEENKSLKEQRKQNDLCFLKILLQKIKTCWNKILRGITEH

(SEQ ID NO:3)

Figura 4

Fcγ1-IL-7 humana

EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSATATPGADCD
IEGKDGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKS LKE
QKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH

(SEQ ID NO:4)

Figura 5

Fcγ2(h)(FN > AO)-IL-7 humana

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSATATPGADCD
IEGKDGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK
LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKE
QKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH

(SEQ ID NO:5)

Figura 6

FCγ1 (ligando1)-IL-7 humana

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAGGG
GSGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICD
ANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGE
AQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH

(SEQ ID NO:6)

Figura 7

FCγ1 (YN > AO (ligando2)-IL-7 humana

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSA TATPGAGGG
GSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEG
MFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTK
SLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH

(SEQ ID NO:7)

Figura 8

Fcγ1 (YN> AO.d)(ligando2)-IL-7 humana

EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPRBEQAQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSATATPGGGGS
GGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGM
FLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL
EENKSLKEQKLLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH

(SEQ ID NO:8)

Figura 9

Fcγ1 humana

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCC
CTCCAGCTCAAGCGGGACAGGTGCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGACAGGCCCCAGCCGGGTGC
TGACAGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCAAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACCGTCTCCTCACCGTCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCCAATGGACAGAGGCCGGCTCG
GCCACCCCTGCCCCGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTACAGCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGCGCC

(SEQ ID NO:22)

Figura 10

Fcyl (YN > AO) humana

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAGG
CCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGA
CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGGCCAGAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCT
GCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGCGCC

(SEQ ID NO:21)

Figura 11

Fcγ2(h) humana

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGG
CCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCACTGTGGCAGGACCG
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTT
CCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG
TGGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCT
GAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCGCCACCCGACCCCGGGCGCC

(SEQ ID NO:20)

Figura 12

Fc γ 2(h)(FN > AO) humana

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAGG
CCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC
CCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCCACCTGTGGCAGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGT
TCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAG
GTGGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATG GACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTTGCCC
TGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCGC CACCGGACCCCGGGTGCA

(SEQ ID NO:19)

Figura 13

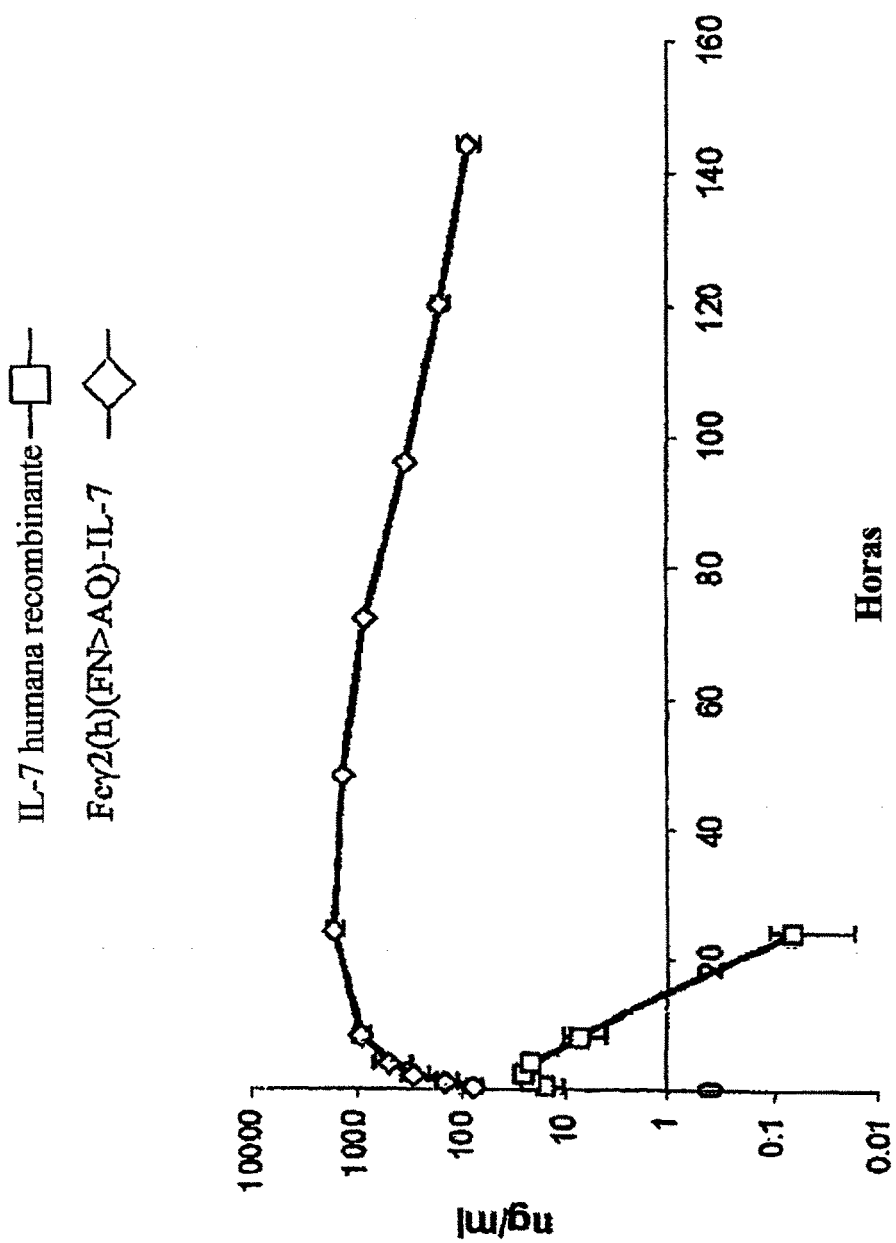


Figura 14

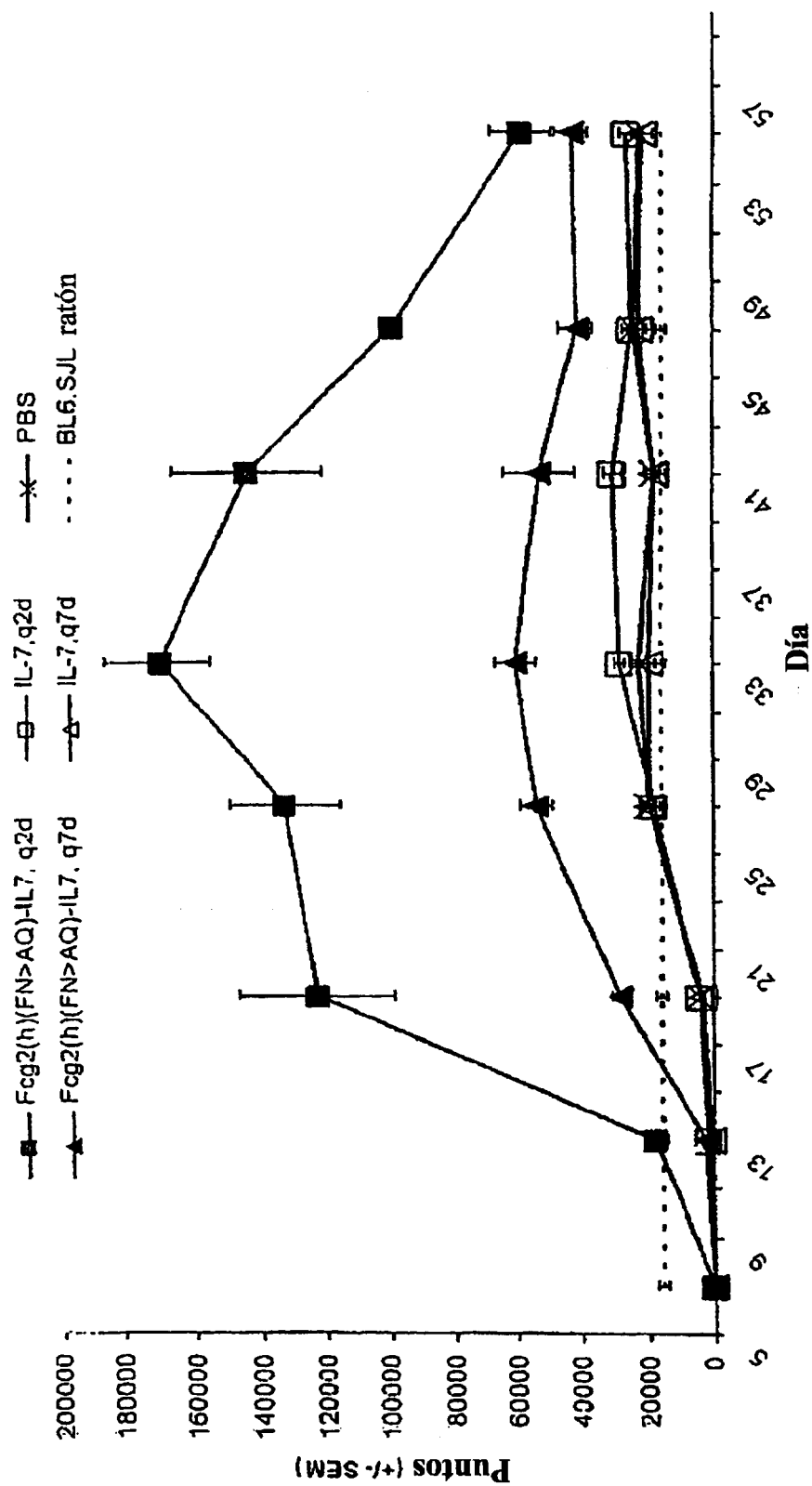


Figura 15

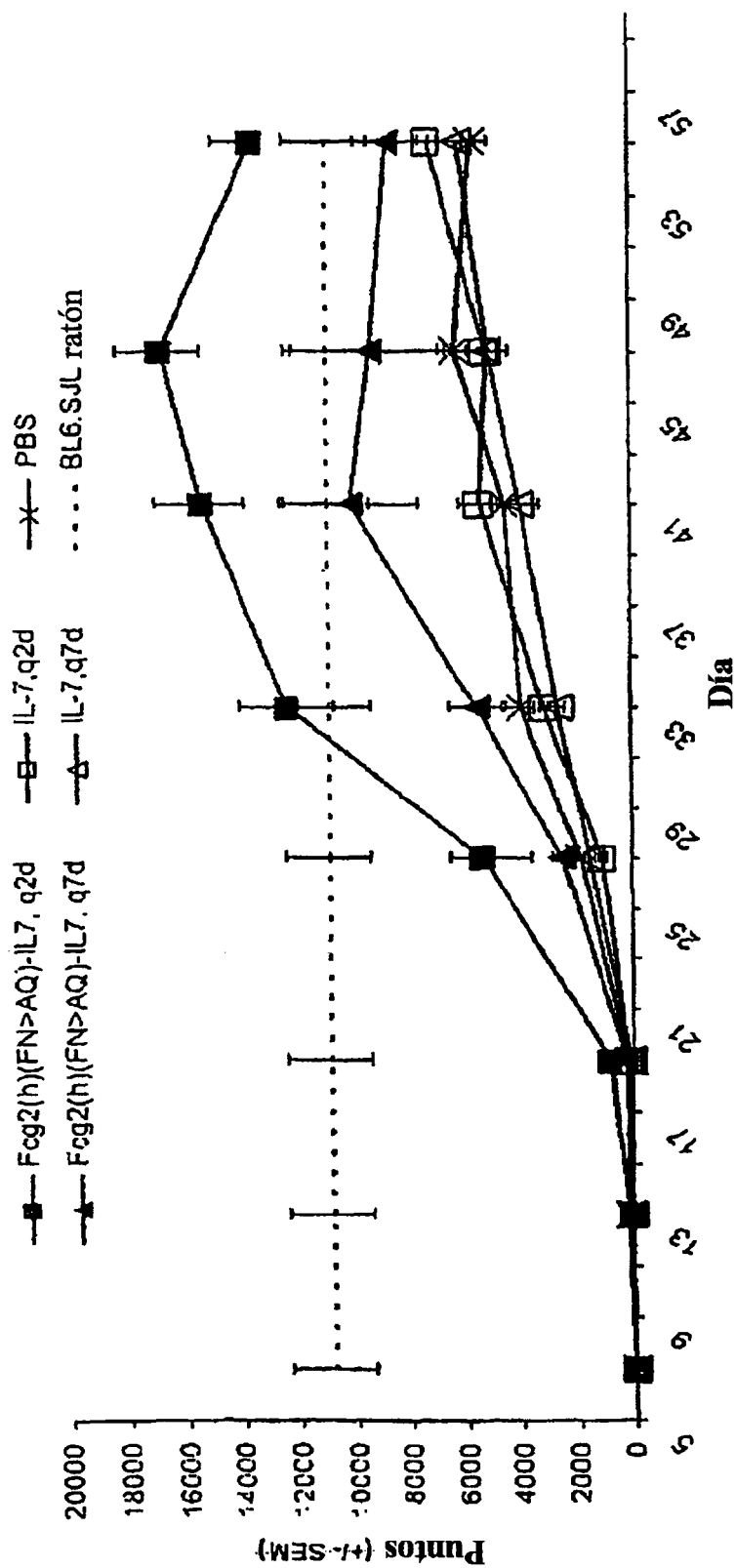
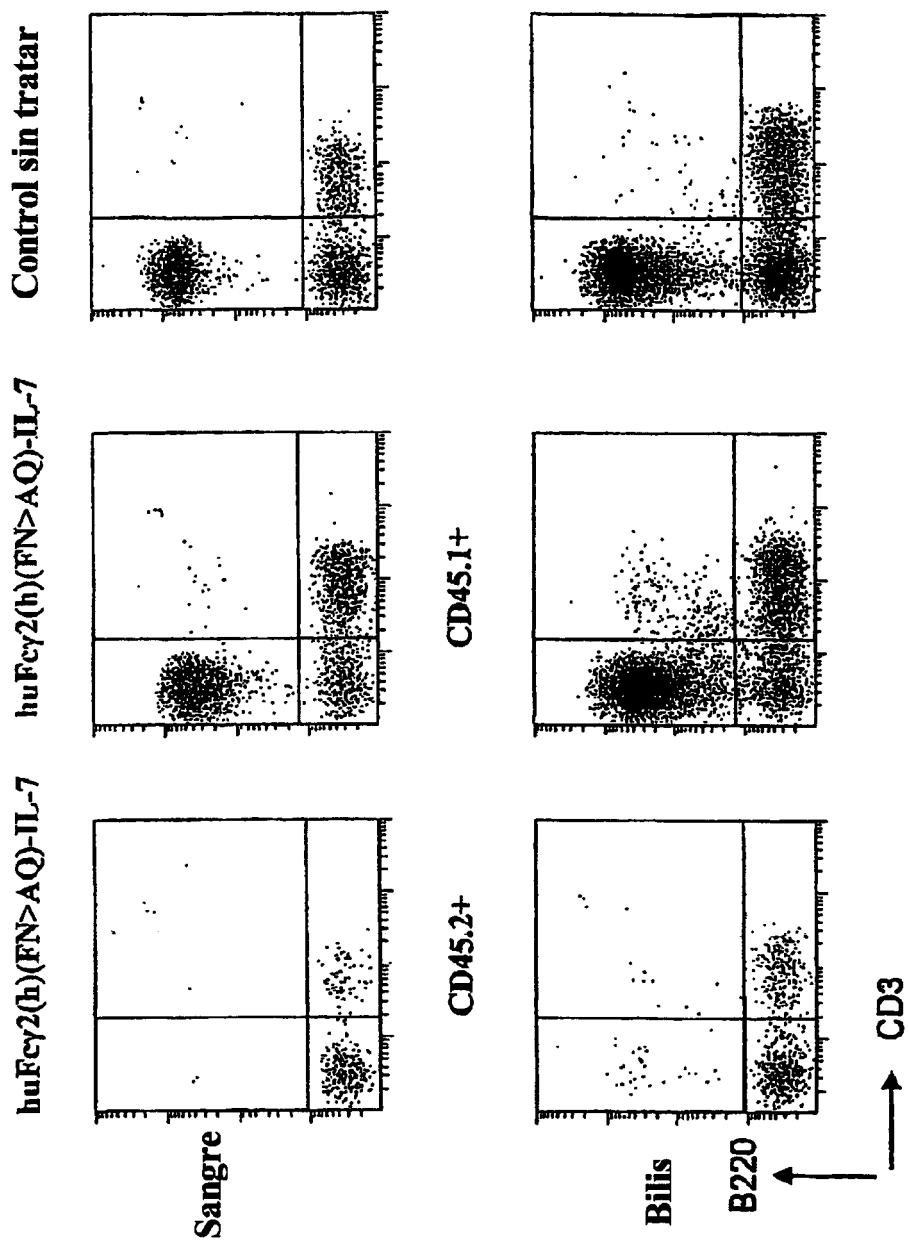


Figura 16



ES 2 305 886 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Lauder, Scott
 Gillies, Stephen
 5 <120> Proteínas de fusión de IL-7
 <130> LEX-026
 <150> US 60/533,406
 10 <151> 2003-12-30
 <160> 38
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 15 <211> 177
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
50           115          120          125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
55           130          135          140

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

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

His
  
```

ES 2 305 886 T3

<210> 2

<211> 176

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 2

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

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

20 Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Asn Val Leu Met Val Asn Ile Asp Asp Leu
35 40 45

25 Asp Asn Met Ile Asn Phe Asp Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

30 Phe Phe Lys Lys His Ser Cys Asp Asp Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu
65 70 75 80

35 Asn Arg Ala Ser Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
85 90 95

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

45 Leu Leu Asn Cys Thr Ser Lys Gly Lys Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu
115 120 125

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

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

60 Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ile Lys Glu His
65 165 170 175

ES 2 305 886 T3

<210> 3

<211> 176

<212> PRT

5 <213> *Ovis aries*

<400> 3

10 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15
 15 Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Phe Ser Gly Lys
 20 25 30
 20 Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Asn Val Leu Met Val Ser Ile Asp Asp Leu
 35 40 45
 25 Asp Asn Met Ile Asn Phe Asp Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60
 30 Phe Phe Lys Lys His Ser Cys Asp Asp Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu
 65 70 75 80
 35 Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
 85 90 95
 40 Asp Asp Phe Lys Leu His Leu Ser Thr Val Ser Gln Gly Thr Leu Thr
 100 105 110
 45 Leu Leu Asn Cys Thr Ser Lys Gly Lys Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu
 115 120 125
 50 Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Asn Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys
 130 135 140
 55 Glu Gln Arg Lys Gln Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Ile Leu Leu Gln
 145 150 155 160
 60 Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ile Thr Glu His
 165 170 175
 65

ES 2 305 886 T3

<210> 4

<211> 384

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc-gamma1-IL-7 humana

10 <400> 4

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

20

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

25

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

30

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

35

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

40

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

45

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

50

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

55

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

60

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

65

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

ES 2 305 886 T3

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

5

Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp

225 230 235 240

10

Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu

245 250 255

15

Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn

260 265 270

20

Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu

275 280 285

25

Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr

290 295 300

30

Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile

305 310 315 320

35

Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu

325 330 335

40

Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys

340 345 350

45

Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln

355 360 365

50

Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

370 375 380

55

60

ES 2 305 886 T3

<210> 5

<211> 383

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc-gamma2(h)(FN>AQ)-IL-7 humana

10 <400> 5

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

15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

20

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

25

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

30

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala
65 70 75 80

35

Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
85 90 95

40

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
100 105 110

45

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

50

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
130 135 140

55

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

60

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

65

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

ES 2 305 886 T3

	180	185	190
5	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 195	200	205
10	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 210	215	220
15	Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly 225	230	235 240
20	Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp 245	250	255
25	Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe 260	265	270
30	Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe 275	280	285
35	Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly 290	295	300
40	Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu 305	310	315 320
45	Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly 325	330	335
50	Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu 340	345	350
55	Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu 355	360	365
60	Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His 370	375	380
65			

ES 2 305 886 T3

<210> 6

<211> 398

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FC-gamma1(ligando1)-IL-7 humana

10 <400> 6

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

20

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

25

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

30

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

35

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

40

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

50

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

55

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

60

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

65

ES 2 305 886 T3

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165

170

175

5

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180

185

190

10

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195

200

205

15

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210

215

220

20

Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

225

230

235

240

25

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys

245

250

255

30

Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser

260

265

270

35

Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe

275

280

285

45

Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg

290

295

300

50

55

60

65

ES 2 305 886 T3

Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp
305 310 315 320

5

Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu
325 330 335

10

Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu
340 345 350

15

Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln
355 360 365

20

Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile
370 375 380

25

Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
385 390 395

30

35

<210> 7

<211> 393

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc-gamma1(YN>AQ)(ligando2)-IL-7 humana

45

50

55

60

65

ES 2 305 886 T3

<400> 7

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

10 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

15 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

20 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

25 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

30 Ala Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

35 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

40 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

45

50

55

60

65

ES 2 305 886 T3

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

5

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

10

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

15

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

20

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

25

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

30

Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

225 230 235 240

35

Gly Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val

245 250 255

40

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly

45

50

55

60

65

ES 2 305 886 T3

260 265 270

5 Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
275 280 285

10 Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
290 295 300

15 Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
305 310 315 320

20 Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
325 330 335

25 Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
340 345 350

30 Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
355 360 365

35 Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
370 375 380

40 Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
385 390

45

50 <210> 8
<211> 391
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Fc-gamma1(YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7 humana

60

65

ES 2 305 886 T3

<400> 8

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

 10 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

 15 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

 20 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

 25 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

 30 Ala Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

 35 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

 40 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

 45 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

 50 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

 55 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

 60 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

 65 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

 70 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

ES 2 305 886 T3

Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp

225 230 235 240

5

Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met

245 250 255

10

Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn

260 265 270

15

Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala

275 280 285

20

Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln

290 295 300

25

Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys

305 310 315 320

30

Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys

325 330 335

35

Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu

340 345 350

45

Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys

355 360 365

50

Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile

370 375 380

55

Leu Met Gly Thr Lys Glu His

385 390

60

65

ES 2 305 886 T3

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Eliminación interna de dieciocho aminoácidos en la mitad IL-7

10 <400> 9

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys

15 **1 5 10 15**

Ser Leu

20
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Extremo de la porción Fc de huFc-gamma1 (YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7

30 <400> 10

Ala Thr Ala Thr Pro

35 **1 5**

<210> 11
<211> 7
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
45 <223> Extremo de la porción Fc de huFc-gamma1 (YN>AQ)(ligando2)-IL-7

<400> 11

Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala

50 **1 5**

<210> 12
55 <211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
60 <220>
<223> Cebador 2 para huFc-gamma1 (YN>AQ,d)(ligando2)-IL-7

<400> 12

65 **atcatgtctg gatccctcga**
20

ES 2 305 886 T3

<210> 17
<211> 7
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Locus SmaI en un cebador

10 <400> 17

cccgggt
7

15

<210> 18
<211> 48
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial
<220>

<223> Oligonucleótido sintético doble para la generación de huFc-gamma1(ligando1)-IL-7

25

<400> 18

gggtgcaggg ggcgggggca gcgggggcgg aggatccggc gggggctc
48

30

<210> 19
<211> 908
35 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico para la región Fc de Fc-gamma2(h) (FN>AQ) humana

<400> 19

gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag
60

45

gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccaggacag
120

50

gccccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcaccac ctgtggcagg
180

55

accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcgatgctt cccggacccc
240

60

tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg
300

65

gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcaggccca
360

ES 2 305 886 T3

**gagcacgttc cgtgtggtea ggcctctcac cgttgtgca caggactggc tgaacggcaa
420**

5

**ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc
480**

10

**caaaaccaa ggtgggacc gcggggtatg agggccacat ggacagaggc cggctcggcc
540**

15

**cacctctgc cctgagagt accgctgtac caacctctgt cctacaggg cagccccgag
600**

20

**aaccacaggt gtacaccctg cccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc
660**

25

**tgacctgect ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg
720**

30

**ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccagct ggactccgac ggctccttct
780**

35

**tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat
840**

40

**gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcggc accgcgacc
900**

45

**cgggtgca
908**

<210> 20

50 <211> 908

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Secuencia de ácido nucleico para la región Fc de Fc-gamma2(h) humana

60

65

ES 2 305 886 T3

<400> 20

gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag
60

5

gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag
120

10

gccccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcaccac ctgtggcagg
180

15

accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc
240

20

tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg
300

25

gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa
360

30

cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa
420

35

ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc
480

40

caaacccaaa ggtgggaccc gcggggtatg agggccacat ggacagaggg cggctcggcc
540

45

cacctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt cctacaggg cagcccgag
600

50

aaccacaggt gtacaccctg ccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc
660

55

tgacctgctt ggtcaaagge ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg
720

60

ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac ggctcctct
780

65

tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat
840

gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcgcc acccgaccc
900

cgggcgcc
908

ES 2 305 886 T3

<210> 21
<211> 911
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico para la región Fc de Fc-gamma1 (YN>AQ) humana
10 <400> 21

**gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag
60**

**gcctcgcctt ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag
120**

**gcccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
180**

**gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac
240**

**ccctgaggtc acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa
300**

**ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcaggc
360**

**ccagagcaag tacctgtggt tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg
420**

**caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat
480**

ES 2 305 886 T3

ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga ggcgggctcg
540

5

gccacacctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc
600

10

gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cacgggagga gatgaccaag aaccaggctca
660

15

gcctgacctg cctggcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca
720

20

atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc gacggctcct
780

25

tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct
840

30

catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc gccaccgcga
900

35

ccccgggcgc c
911

40

<210> 22

<211> 911

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Ácido nucleico para la región Fc de Fc-gamma1 humana

50

55

60

65

ES 2 305 886 T3

<400> 22

**gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag
60**

5

**gcctcgccct ccagctcaag gggggacagg tgccctagag tagcctgcat ccaaggacag
120**

10

**gccccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
180**

15

**gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac
240**

20

**ccctgaggtc acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa
300**

25

**ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta
360**

30

**caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctcg caccaggact ggctgaatgg
420**

35

**caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacct
480**

40

**ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga ggccggctcg
540**

45

50

55

60

65

ES 2 305 886 T3

gcccaccctc tgcctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgccttaca gggcagcccc
600

5

gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cacgggagga gatgaccaag aaccaggtca
660

10

gcctgacctg cctggc aaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca
720

15

atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc gacggctcct
780

20

tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct
840

25

catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc gccaccgcga
900

30

ccccggggcg c
911

<210> 23

35 <211> 9

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Comienzo de la región bisagra como se ha mostrado en la figura 20

<400> 23

45 **gagcccaaa**
9

<210> 24

50 <211> 7

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Secuencia AfII

<400> 24

60 **cttaagc**
7

<210> 25

65 <211> 9

<212> PRT

ES 2 305 886 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Ligando 2 para las proteínas de fusión de Fc-IL-7
5
<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
10
1 5

<210> 26
15 <211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> Substitución de la secuencia en las proximidades del extremo C de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina
<400> 26
25

Ala Thr Ala Thr
30
1

<210> 27
<211> 4
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia en las proximidades del extremo C de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina
40
<400> 27

Leu Ser Leu Ser
45
1

<210> 28
50 <211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> Substitución de la secuencia dentro de de una cadena pesada IgG1
<400> 28
60

Gln Ala Gln Ser
1
65

<210> 29
<211> 4

ES 2 305 886 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia dentro de una cadena pesada IgG1

<400> 29

10 **Gln Phe Asn Ser**

1

15 <210> 30

<211> 4

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia procedente de IgG1

25 <400> 30

Gln Tyr Asn Ser

30 **1**

<210> 31

35 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia procedente de la IL-7

<400> 31

45 **Met Asn Ser Thr Gly**

1

5

50 <210> 32

<211> 5

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia procedente de la IL-7

60 <400> 32

Leu Asn Cys Thr Gly

65 **1**

5

ES 2 305 886 T3

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso flanqueante para la generación de las proteínas de fusión de Fc-gamma1-IL-7

10 <400> 33

cagggtgtac acctgtgggt c
21

15

<210> 34
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Ligando 1 para la generación de las proteínas de fusión de Fc-IL-7
25
<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 35
35 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Secuencia procedente de la IL-7

<400> 35

45
Ser Leu Glu Glu Asn Lys
1 5

50
<210> 36
<211> 28
<212> DNA
55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador mutagénico en el sentido codificante
60 <400> 36

agcaggcca gagcacgtac cgtgtgggt
28

65

ES 2 305 886 T3

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hebra complementaria del cebador mutagénico en el sentido codificante

10 <400> 37

gtacgtgctc tgggccctgct cctcccgc
28

15

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador flanqueante en el sentido 3'

25

<400> 38

ctctctgcag agcccaaac t
21

30

35

40

45

50

55

60

65