



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 175**

51 Int. Cl.:

C12N 15/26 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99924232 .4**

86 Fecha de presentación : **13.05.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1076704**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2001**

54 Título: **Agonistas y antagonistas selectivos de IL-2.**

30 Prioridad: **15.05.1998 US 80080**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **AiCuris GmbH & Co. KG.**
Friedrich-Ebert-Strasse 475
42117 Wuppertal, DE

72 Inventor/es: **Shanafelt, Armen, B.;**
Greve, Jeffrey, M.;
Jesmok, Gary;
Lembach, Kenneth, J. y
Wetzel, Gayle, D.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 281 175 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

Agonistas y antagonistas selectivos de IL-2.

5 Antecedentes

1. Campo de la invención

La invención se refiere de manera general a los campos de la farmacología e inmunología. De manera más específica, la invención se dirige a nuevas composiciones de materia para activar de manera selectiva las células T (blastos PHA), y que tienen reducida la activación de las células Asesinas Naturales ("NK"). Las nuevas composiciones incluyen variantes de la familia de las citoquinas, y en particular la Interleuquina-2 humana ("IL-2").

2. Descripción de la técnica relacionada

La Interleuquina 2 (IL-2) es un potente inmunoestimulador, que activa diversas células del sistema inmune, que incluyen las células T, las células B, y los monocitos. La IL-2 es también un potente y crítico factor de crecimiento de las células T. Fue en virtud de estas actividades que se ensayó IL-2 por su capacidad para tratar el cáncer. La IL-2 humana es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma renal metastático y el melanoma metastático. El uso de IL-2 en pacientes elegibles es restringido debido a la grave toxicidad asociada con la terapia de IL-2; se estima que en el mejor de los casos, únicamente un 20% de pacientes elegibles reciben realmente la terapia. Las toxicidades asociadas con la terapia de IL-2 incluyen fiebre grave, náusea, vómitos, derrame vascular e hipotensión grave. A pesar de estas toxicidades, sin embargo, IL-2 es eficaz para sus indicaciones aprobadas (un índice de respuesta objetivo aproximadamente del 17%).

Aunque ha sido extensivo el análisis de estructura/función de la IL-2 de ratón (Zurawski, S. M. y Zurawski, G. (1989) *Embo J*, 8: 2583-2590; Zurawski, S. M. y col., (1990) *Embo J*, 9: 3899-3905; Zurawski, G. (1991). *Trends Biotechnol.*, 9: 250-257; Zurawski, S. M. y Zurawski, G. (1992) *Embo J*, 11: 3905-3910. Zurawski, y col., *EMBO J*, 12, 5113-5119 (1993)), únicamente se ha producido un análisis limitado de la IL-12 humana. La mayor parte de los estudios con muteínas de IL-2 humanas se han llevado a cabo sobre células murinas; sin embargo, se han producido estudios limitados usando blastos PHA humanos, que expresan la alta afinidad del receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de IL-2. Los estudios usando blastos PHA confirmaron la importancia de los restos Asp-20 y la hélice D de la IL-2 humana. Se ha demostrado que las posiciones Asp-20 y Gln-126 de la IL-2 humana son los restos principales responsables de la interacción con las subunidades β y γ del receptor de IL-2, de manera respectiva (revisado en Thèze, y col., *Immunol. Today*, 17, 481-486 (1996)). Aunque se ha demostrado que los restos de la hélice C de la IL-2 de ratón están implicados en la interacción con IL-2R β de ratón (Zurawski, y col., *EMBO J*, 12, 5113-5119) (1993)), no se ha demostrado que los restos equivalentes en la IL-2 humana tengan las mismas propiedades (estos restos en la IL-2 humana podrían ser Asp-84 y Asn-88). Debido a que se muestra una especificidad significativa de especies entre la IL-2 humana y la de ratón (IL-2 humana presenta aproximadamente una actividad reducida 100 veces en los sistemas murinos), es difícil predecir si se están produciendo el mismo tipo de interacciones dentro del límite de la especie. No se conocen estudios que usen células que expresan únicamente el receptor IL-2R $\beta\gamma$ humano de afinidad intermedia.

Se han examinado algunas muteínas de IL-2 humanas por su actividad en los blastos PHA humanos (Xu, y col., *Eur Cytokine Netw*, 6, 237-244 (1995)). Se demuestra que las muteínas que contienen sustituciones de Asp-20 con Leucina (D20L), así como con Arginina, Asparagina, y Lisina, tienen defectos graves en su capacidad para inducir la proliferación de blastos PHA. De esta manera, esta técnica enseña que la sustitución de Asp-20 dará como resultado muteínas de actividad comprometida. De manera adicional, Xu, y col afirman que hasta la fecha (1995) no se han identificado muteínas IL-12 útiles para las aplicaciones químicas o de investigación.

La muteína Q126D de IL-2 humana generada por Buchli y Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys.*, 307(2): 411-415, (1993) mostró una actividad significativamente comprometida en la potencia y el agonismo; en ensayos de células T humanas, presentó aproximadamente 1.000 veces menos actividad que la IL-2 y se comportó como un agonista parcial. En los ensayos de células T murinas, la muteína fue casi inactiva. Ambas líneas celulares ensayadas expresaron la forma de alta afinidad del receptor IL-2. En ambos tipos de células, Q126D desarrolló la capacidad de antagonizar la actividad mediada por IL-2, aunque sólo parcialmente en el ensayo de células T humanas.

Zhi-Yong, W., y col., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 25(5): 558-560 (Sept. 1993) llevaron a cabo experimentos de sustitución en las posiciones 62, 69, 99 y 126 de IL-2 demostrando una reducción en la actividad de 20 veces y 30 veces en comparación con la IL-2 de tipo salvaje, con 62-Leu-IL-2 y 126-Asp-IL-2, de manera respectiva, en un ensayo de células T de ratón (CTL-2). Sin embargo, no existe enseñanza o sugerencia de que las sustituciones en la posición 126 puedan conferir actividad selectiva de las células T sobre las células NK, o indicar si dichos cambios podrían tener un efecto similar en las células T humanas.

Collins, L., y col., *PNAS USA*, 85: 7709-7713 (1988) informaron que la sustitución de Asp en la posición 20 con cualquiera de Asn (D20N) o Lys (D20K) dio como resultado una pérdida de enlace aproximadamente de 100 a 1000 veces en relación con la IL-2 humana para el receptor de afinidad alta (IL-2R $\alpha\beta\gamma$, denominado p55/p70 en Collins y col) e intermedia (IL-2R $\beta\gamma$, denominado "p70" en Collins, y col). La unión con IL-2R α pareció no afectar a ambas proteínas mutantes. Este trabajo enseña que la interrupción de la unión con el receptor IL-2 de afinidad intermedia (IL-

2R $\beta\gamma$) conduciría también a la interrupción de la unión con el receptor IL-2 de alta afinidad (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), sugiriendo que la unión o la activación diferencial entre IL-2R $\beta\gamma$ o IL-2R $\alpha\beta\gamma$ no es conseguible mediante la sustitución de Asp en la posición 20.

- 5 Berndt, W. G. y col., *Biochemistry*, 33(21): 6571-6577 (1994) usaron la mutagénesis de módulos combinatorios para mutar de manera simultánea las posiciones 17-21 en la IL-2 nativa, que son sospechosas de interaccionar con el receptor IL-2 de afinidad intermedia. De los 2610 clones seleccionados, únicamente 42 fueron activos. Encontraron que las posiciones 20 y 21 fueron de importancia principal para la actividad biológica. No existen sugerencia o enseñanza de sustituciones individuales excepto para L21V.

10 La Patente de los Estados Unidos N° 5.229.109 (Grimm, y col) describe según se afirma la baja toxicidad de los análogos de IL-2 para el uso en el tratamiento de inmunoterapia y del cáncer. Se analizaron las propiedades de dos análogos de IL-2 con sustituciones en las posiciones Arg38 (por Alanina) y Phe42 (por Lisina) y se compararon aquellas con la IL-2 nativa. Se encontró que los análogos eran capaces de mantener su capacidad para unirse al receptor
15 IL-2 intermedio, mientras que se unían sólo minimamente con el así denominado receptor de "alta afinidad". En este momento se pensó que el receptor de afinidad intermedia estaba constituido únicamente por p75 (IL-2R β), y se pensó que el receptor de alta afinidad estaba constituido únicamente por el complejo receptor p55 + p75 (IL-2R $\alpha\beta$). Los análogos también mantuvieron su capacidad para estimular las células mononucleares de la sangre periférica para generar una muerte activada por linfoquina (LAK). Los restos aminoácidos descritos en esta patente son aquellos
20 que podrían interaccionar de manera específica con IL-2R α (p55); la eliminación de las interacciones con IL-2R α podría dar como resultado una actividad reducida en las células que portan el receptor IL-2 de alta afinidad, y podrían no afectar la actividad de las células que portan el receptor IL-2 de afinidad intermedia. De esta manera, debería mantenerse la generación de células LAK (que se piensa que derivan de las células NK). Las muteínas descritas en el presente documento se dirigen a los restos aminoácidos en la posiciones 20, 88, y 126; se piensa que estas posiciones
25 interaccionan de manera específica con IL-2R β (p75; posiciones 20 y 88), e IL-2R γ (no conocido en el momento de registrar la patente de Grimm, y col; posiciones 126). Como consecuencia, permanecen sin cambiar las interacciones con IL-2R α . Mecánicamente, la muteínas descritas por Grimm, y col, tendrán interacciones disminuidas con el receptor IL-2 de alta afinidad, pero no tendrán efecto sobre el receptor IL-2 de afinidad intermedia; las muteínas descritas en el presente documento tienen las características opuestas, poseyendo un pronunciado defecto en su capacidad para
30 interactuar con el receptor IL-2 de afinidad intermedia IL-2R $\beta\gamma$, y muestran un pequeño o no muestran defecto en las interacciones funcionales con el receptor IL-2 de alta afinidad, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

La Patente de los Estados Unidos N° 5.206.344, (Goodson y col.) describe muteínas de IL-2 en las que uno de los aminoácidos de la secuencia nativa madura de IL-2 se sustituye por un resto cisteína, que entonces se preparan y
35 conjugan a través del resto cisteína sustituido en un polímero seleccionado entre los homopolímeros de polietilenglicol o los polioles polioxiethylados, en los que los homopolímeros son no sustituidos o sustituidos en un extremo con un grupo alquilo. Se fabrican estas muteínas mediante la expresión en el huésped de los genes mutantes que codifican las muteínas que se han cambiado a partir de los genes para las proteínas de origen mediante la mutagénesis dirigida a sitio. De manera adicional, se pueden conjugar otras especies de IL-2 mediante el resto cisteína en la posición 125 de
40 la proteína IL-2 madura que no es necesario para la actividad biológica de IL-2. No existe descripción de mutaciones que confieran toxicidad reducida.

La Patente de los Estados Unidos n° 4.959.314 (Lin y col.) describe muteínas de proteínas biológicamente activas tales como IFN- β cuyos restos cisteína que no son esenciales para la actividad biológica se han delecionado o sustituido
45 con otros aminoácidos para eliminar los sitios para el entrecruzamiento intermolecular o la formación de puentes de disulfuro intramoleculares incorrectos. Se fabrican estas muteínas mediante la expresión bacteriana de los genes mutantes que codifican las muteínas que se han sintetizado a partir de los genes para las proteínas de origen mediante la mutagénesis dirigida a oligonucleótido. No existe descripción de mutaciones que confieran toxicidad reducida.

50 La Patente de los Estados Unidos n° 5.116.943 (Halenbeck y col.) describe que una proteína terapéutica de referencia biológicamente activa se protege frente a la oxidación mediante un procedimiento que implica sustituir un aminoácido conservador por cada resto metionilo susceptible de oxidación por cloramina T o peróxido, en la que los restos metionilo no susceptibles adicionales, no se sustituyen de esta manera. La muteína resistente a la oxidación producida de esta manera es de manera preferible una muteína humana de interleuquina 2 o interferón- β , y el
55 aminoácido conservador más preferible es la alanina. No existe descripción de mutaciones que confieran toxicidad reducida.

La Patente de los Estados Unidos N° 4.853.332 (Mark y col.) se dirige a las muteínas IFN- γ e IL-2 cuyos restos cisteína que no son esenciales para la actividad biológica se han delecionado o sustituido por otros aminoácidos para
60 eliminar los sitios para el entrecruzamiento intermolecular o la formación de puentes de disulfuro intramoleculares incorrectos. La patente describe que una sustitución en IL-2 en la cisteína 125 por serina da como resultado una muteína con actividad comparable a la de la IL-2 nativa.

La Patente de los Estados Unidos N° 5.696.234 (Zurawski y col.) se dirige a las muteínas de las citoquinas de mamíferos, y a los procedimientos para seleccionar los antagonistas y antagonistas de las citoquinas de mamíferos. De manera concreta, se demuestra que la doble muteína P82A/Q126D de IL-2 humana tiene actividad antagonista sobre
65 las células Baf3 murinas cotransfectadas con subunidades α y β de IL-2R. Se demuestra poca actividad agonista. También, se demuestra que las muteínas de IL-2 murina presentan actividad agonista y antagonista parcial sobre las

células HT2, de manera concreta Q141D, Q141K, Q141V, y Q141L. No se describen actividades de la muteína que muestren o sugieran un efecto agonista selectivo para las mutaciones en las posiciones 20, 88 y 126.

Zurawski, y col., describen muteínas de IL-2 murinas que tienen las propiedades de ser activas en células que expresan IL-2 $\alpha\beta\gamma$ pero inactivas en células que expresan IL-2 $\beta\gamma$ (Zurawski, G., *Trends Biotecnol.*, 9:250-257 (1991); Zurawski, S. M. y Zurawski, G. *Embo. J.*, 11: 3905-3910 (1992)). Las muteínas de IL-2 murinas que presentan estas propiedades tenían las sustituciones Asp-34 por Ser o The, y Gln-141 por Lys. Asp-34 y Gln-141 de IL-2 de ratón parecen equivalentes a Asp-20 y Gln-141 de IL-2 humana, de manera respectiva. Aunque estas referencias se refieren a las muteínas de IL-2 "agonistas selectivas", no describen su potencial como menos tóxico, sino más bien como antagonistas potenciales de IL-2 endógenas.

El Documento EP 0267 795 A2 (Zurawski y col.) describe una variedad de muteínas de IL-2 de ratón, desde el principio hasta el fin de la secuencia, que incluyen algunas que contienen delecciones y/o sustituciones en el interior de los primeros treinta restos aminoácidos N-terminales que con biológicamente competentes, pero esto no incluye, describir o sugerir las sustituciones de aminoácidos descritas aquí en los restos equivalentes de IL-2 de ratón. Existe una necesidad de una molécula de IL-2 mejorada que tenga toxicidad reducida y se tolere de manera más general.

Taniguchi y col., Documento US 4.738.927 se dirigen a un ADN recombinante que comprende un ADN recombinante que codifica un polipéptido que posee una actividad biológica de IL-2, en el que dicha actividad es la estimulación del crecimiento de la línea celular de linfocitos T citotóxicos, y un vector de ADN capaz de propagarse en una célula procariota o eucariota, localizándose la secuencia de codificación de dicho gen en una posición cadena abajo de una secuencia del promotor, en la que dicho polipéptido tiene 132 a 134 aminoácidos en total en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Se describe también un gen, los vectores de ADN recombinante, las células huésped, y los procedimientos para producir de manera recombinante IL-2 nativa. Taniguchi y col., no describen ningún variante o las muteínas, y no enseñan qué posiciones en la proteína son responsables de la actividad de señalización o enlace.

Eckenberg, R. y col describen Analysis of Human IL-2/IL-2 receptor beta Chain interactions: monoclonal antibody H2-8 and new IL-2 mutants define the critical role of alpha helix-A of IL-2, Cytokine, vol 9, n° 7, Julio 1997 (1997-07), páginas 488-498;

El Documento WO 96 04306 A (Schering Corporation (US); Zurawski S. M.; Zurawski G.) se refiere a las Muteínas de las Citoquinas de Mamíferos;

JU G. y col.: describen el Structure-function analysis of human Interleukin-2 Journal of Biological Chemistry, vol 262, n° 12, 25 de Abril 1987 (1987-04-25), páginas 5723-5731 y

Ernst J. F. y col. se refieren a Screening of muteins secreted by yeast: random mutagenesis of human Interleukin-2 Bio/Technology, vol. 7, n°. 7, 1 de Julio de 1989 (1989-07-01), páginas 716-720.

Resulta claro que las muteínas de IL-2 que no presentan toxicidad limitada por la dosis de las muteínas de IL-2 recombinantes de la técnica anterior se necesitan para tener la ventaja terapéutica del potencial de esta citoquina.

Resumen de la invención

La invención se dirige a un polipéptido que comprende una muteína de IL-2 humana numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje en la que dicha IL-2 humana está sustituida en al menos una de las posiciones 2, 88 ó 126, en la que dicha muteína activa de manera preferente las células T sobre las células NK. Esta invención crea una muteína de IL-2 menos tóxica que permite un mayor uso terapéutico de esta interleuquina.

De manera adicional, la invención se dirige a las muteínas de IL-2 que tienen una única mutación en las posiciones del Aspartato 20, Asparagina 88, y Glutamina 126. Se representan las muteínas específicas mediante los designadores D20X, N88X, y Q126X, en los que "X" es un aminoácido específico que cuando se sustituye en la IL-2 humana, confiere actividad selectiva a las células que expresan el receptor IL-2 $\alpha\beta\gamma$ (por ejemplo, las células T) con preferencia frente a las células que expresan el receptor IL-2 $\beta\gamma$ (por ejemplo, las células NK). Las muteínas que presentan selectividad mayor de 1000 veces incluyen D20H, D20I, N88G, N88I, N88R, y Q126L. De manera concreta, estas muteínas presentan también esencialmente actividad de IL-2 de tipo salvaje en las células T. Se identifican también otras mutaciones que proporcionan selectividad de menos de 1000 veces pero mayor de 10 veces. La invención incluye también polinucleótidos que codifican la muteína de la invención, los vectores que contienen los polinucleótidos, las células huésped transformadas, las composiciones farmacéuticas que comprenden las muteínas, y los procedimientos terapéuticos de tratamiento que usan las muteínas.

La invención se dirige también a un procedimiento para seleccionar las muteínas de IL-2 mediante la evaluación en ensayos que utilizan IL-2 $\alpha\beta\gamma$, en comparación con IL-2 $\beta\gamma$, en el que la actividad de una muteína de IL-2 se aumenta en relación con la IL-2 de tipo salvaje en un ensayo preferente con respecto al otro. IL-2 $\alpha\beta\gamma$ e IL-2 $\beta\gamma$ son los ectodominios de la subunidad del receptor individual en combinación apropiada, y se usan para medir directamente la unión de las muteínas de IL-2 con cada complejo de receptor. El ensayo IL-2ab utiliza una respuesta de un tipo de célula que porta IL-2 $\alpha\beta\gamma$, y el ensayo IL-2 $\beta\gamma$ utiliza una respuesta de un tipo de célula que porta IL-2 $\beta\gamma$. La célula

que porta IL-2 $\alpha\beta\gamma$ es un blasto PHA, y la célula que porta IL-2 $\beta\gamma$ es una célula NK. El ensayo es de proliferación para el tipo de célula que porta IL-2R $\alpha\beta\gamma$ y el tipo de célula que porta IL-2 $\beta\gamma$.

La invención se dirige también a un vector que comprende el polinucleótido que codifica una muteína de esta invención, el vector que dirige la expresión de una muteína de IL-2 humana que tiene la actividad que activa células blasto PHA pero que tiene una actividad que activa células NK reducidas, siendo capaz el vector de permitir la transfección de un organismo diana y la posterior expresión *in vivo* de dicha muteína de IL-2 humana codificada por dicho polinucleótido.

La presente solicitud describe también un procedimiento para tratar un paciente afligido por una dolencia tratable con IL-2 administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de IL-2 humana numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje que tiene la actividad que activa blastos PHA pero que tiene reducida la actividad que activa células NK. Este procedimiento es aplicable cuando la enfermedad tratable con IL-2 es VIH, Cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa, adyuvante de la vacuna en la terapia de vacuna del cáncer y vacuna convencional, para estimulación inmune en los ancianos u otros inmunocomprometidos, así como en pacientes con SCID humanos, u otras aplicaciones terapéuticas que requieren la estimulación del sistema inmune.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 a 7 muestran las curvas de dosis-respuesta de la IL-2 humana de tipo salvaje (IL-2) y D20H (Fig. 1), IL-2 y D20I (Fig. 2), IL-2 y N88G (Fig. 3); IL-2 y N88I (Fig. 4), IL-2 y N88R (Fig. 5), IL-2 y Q126E, (Fig. 6), e IL-2 y Q126L (Fig. 7). A: Dosis respuesta individual de IL-2 (círculos negros) y muteína (círculos blancos) en el ensayo de proliferación de células T humanas primarias (blastos PHA). B: Dosis respuesta individual de IL-2 (triángulos negros) y muteína (triángulos blancos) en el ensayo de proliferación de células NH humanas primarias.

Figuras 8A-8D. Se evaluó la toxicidad de PROLEUKINTM en chimpancé en dos animales (X-159, triángulos, y X-124, cuadrados), en comparación con el vehículo control (X-126, diamantes). Se evaluó la toxicidad mediante los parámetros renales (Nitrógeno de Urea en Sangre (BUN), A; Creatinina, B) y la función hepática (bilirrubina total, C; ALT, D).

Figura 9. Gráfico del cambio de porcentaje de peso corporal a lo largo de 30 días. Se midió el peso corporal para los animales tratados con IL-2/N88R (triángulos), PROLEUKIN (cuadrados) o vehículo (diamantes) en los días indicados.

Figuras 10A-10D. Se evaluaron los linfocitos (A), los glóbulos blancos totales, los neutrófilos (C), y las plaquetas (D) para los animales tratados con IL-2/N88R (triángulos), PROLEUKIN (cuadrados) o vehículo (diamantes) en los días indicados.

Figuras 11A-11D. Se evaluaron el nitrógeno de urea en sangre (A, BUN), la creatinina (B), el fósforo (C), y el vacío de aniones (D) para los animales tratados con IL-2/N88R (triángulos), PROLEUKIN (cuadrados) o vehículo (diamantes), en los días indicados.

Figuras 12A-12D. Se evaluaron la bilirrubina total (A), ALT (B), el fibrinógeno (C), y el tiempo de protombina activado (D) para los animales tratados con IL-2/N88R (triángulos), PROLEUKIN (cuadrados) o vehículo (diamantes), en los días indicados.

Figuras 13A-13D. Se evaluaron los niveles de sodio en sangre (A), el ión cloruro (B), el calcio (C), y el potasio (D) para los animales tratados con IL-2/N88R (triángulos), PROLEUKIN (cuadrados) o vehículo (diamantes), en los días indicados.

Figuras 14A-14C. Se evaluaron los niveles de albúmina en sangre (A), el hematocrito (B), y la hemoglobina (C) para los animales tratados con IL-2/N88R (triángulos), PROLEUKIN (cuadrados) o vehículo (diamantes), en los días indicados.

Figuras 15A-15C. Se indicó el efecto de IL-2/N88R (cuadrados), PROLEUKIN (diamantes), y vehículo (triángulos) para la población total de células T (A, células CD3+), población de células T CD4+ (B), y la población de células T CD8+ (C).

Figuras 16A-16C. Se indicó el efecto de IL-2/N88R (cuadrados), PROLEUKIN (diamantes), y vehículo (triángulos) para la población total de células T (A, células CD3+), población de células T CD4+ (B), y la población de células T CD8+.

Figura 17. Efecto de IL-2/N88R y PROLEUKIN sobre la activación de las células T con respecto a la media de la fluorescencia de las células CD25 positivas. Se indicó el efecto de IL-2/N88R (cuadrados), PROLEUKIN (diamantes), y el vehículo (triángulos) para la población de células T CD3+CD4+. Se obtuvieron cantidades insuficientes de células CD3+CD8+ para evaluar la media de la fluorescencia en esta población.

Figuras 18A-18D. Se indicó el efecto de IL-2/N88R (cuadrados), PROLEUKIN (diamantes) y vehículo (triángulos) para la población de células T CD4+ (A, células CD3+/CD4+), la población de células T CD8+ (B, células CD3+/CD8+), la población total de células T (C, células CD3+) y la población de células NK (D, células CD3-/CD16+).

Figura 19. Gráfico de la metástasis en pulmón frente a la dosis en ratones tratados con PROLEUKIN (círculos blancos) o IL-2/N88R (círculos negros). Se contó la metástasis del pulmón en la conclusión del estudio.

Figura 20. Mapa del plásmido del vector pBC1IL2SA de IL2N88R.

Descripción de las formas de realización preferidas

A. Antecedentes

La acción de IL-2 en las células T está mediada por la unión con las proteínas del receptor IL-2. Hay proteínas diferenciadas en la superficie celular que se unen con IL-2. La primera que se identificó fue un polipéptido sencillo, denominado IL-2R α , que es un polipéptido de 55 kD (p55) que aparece tras la activación de las células T y se denominó originalmente antígeno Tac (por la activación T). IL-2R α se une a IL-2 con una K_d de aproximadamente 10^{-8} M, y se conoce también como receptor IL-2 de "baja afinidad". La unión de IL-2 con las células que expresan únicamente IL-2R α , no conduce a ninguna respuesta biológica detectable.

El segundo receptor IL-2 es un complejo de unión compuesto por IL-2R β e IL-2R γ ; IL-2R γ , un polipéptido de 64 kD, se conoce también como la cadena común γ (γ_c) debido a que ésta se comparte entre numerosos receptores de citoquinas. IL-2R β es aproximadamente de 70 a 75 kD (denominada de manera diversa p70 o p75) y es un miembro de la familia del receptor de citoquinas de tipo I caracterizado por las dos motivos de cisteína/WSXWS. IL-2R β se expresa de manera coordinada con γ_c . La afinidad de unión de IL-2 con IL-2R $\beta\gamma_c$ es más alta que con IL-2R α , con una K_d de aproximadamente 10^{-9} M; se conoce también como el receptor IL-2 de "afinidad intermedia". IL-2 provoca crecimiento de las células que expresan IL-2R $\beta\gamma_c$ produciéndose la estimulación del crecimiento semimáxima a la misma concentración de IL-2 que produce la unión semimáxima (es decir, 1×10^{-9} M). IL-2R $\beta\gamma_c$ es el mismo complejo receptor de señalización que puede unirse a IL-15.

El tercer complejo de receptor IL-2 conocido es el complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$. Las células que expresan IL-2R α y IL-2R $\beta\gamma_c$ pueden unirse a IL-2 mucho más estrechamente, con una K_d de aproximadamente 10^{-11} M, y de esta manera se conoce también como complejo de "alta afinidad". La estimulación del crecimiento de dichas células se produce a una concentración similarmente baja de IL-2. Se pueden bloquear la unión y la estimulación del crecimiento de IL-2 mediante anticuerpos contra IL-2R α , IL-2R β , o γ_c y de manera más eficiente, mediante una combinación de anticuerpos contra múltiples subunidades del receptor. Estas observaciones sugieren que IL-2R α forma un complejo con IL-2R $\beta\gamma_c$ que aumenta la afinidad del receptor de señalización por IL-2 y permite por tanto una señal de crecimiento que se va a liberar a concentraciones significativamente más bajas de IL-2. Se cree que IL-2 se une rápidamente en primer lugar con IL-2R α , y esto facilita la asociación con IL-2R $\beta\gamma_c$. Las células T en reposo expresan IL-2R $\beta\gamma_c$ pero únicamente cantidades bajas de IL-2R α ; se puede estimular el incremento de IL-2R α expresado en la superficie mediante IL-2. Tras la activación de las células T mediada por el receptor del antígeno, IL-2R α se expresa rápidamente, reduciendo por tanto la concentración de IL-2 necesaria para la estimulación del crecimiento. La unión de IL-2 con el complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ da como resultado una señal de transducción a través de la vía de señalización Jak/STAT.

Los inventores han descubierto muteínas de la IL-2 humana que activan de manera preferente las células T (blastos PHA; células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de IL-2 de alta afinidad) en relación con las células Asesinas Naturales (NK) (células que expresan el receptor IL-2R γ del IL-2 de afinidad intermedia). Las muteínas que sustituyen Asp-20 con Histidina (D20H) o isoleucina (D20I), Asn-88 con Arginina (N88R), Glicina (N88G), o Isoleucina (N88I), o Gln-126 con Leucina (Q126L), o Glutamato (Q126E) presentan de manera inesperada actividad completa de IL-2 en los blastos PHA, y poca (si alguna) actividad en las células NK. Los estudios previos de las muteínas IL-2 humanas se han basado en los sistemas de análisis celulares murinos, y cuando se han usado células humanas, no se han utilizado células que expresan únicamente IL-2R $\beta\gamma$ (tal como las células NK). De manera adicional, aquellos estudios que utilizan blastos PHA humanos han demostrado que la sustitución de Asp-20 (con Leu, Arg, Asp, o Lys; Xu, y col., *Eur. Cytokine Netw*, **6**, 237-244 (1995)) o Gln-126 (con Asp; Buchli y Ciardelli, *Arch. Biochem. Biophys*, **307**(2): 411-415, (1993)) dan como resultado muteínas de IL-2 humanas que tienen la actividad gravemente comprometida. Los estudios previos usando IL-2 murina identificaron muteínas de IL-2 de ratón con actividades diferentes (Zurawski, y col., *EMBO J*, **12**, 5113-5119 (1993)), pero ninguna mutación que diera estos resultados sugiere aquellos identificados en el trabajo descrito en el presente documento. Las muteínas IL-2 humanas que contienen mutaciones idénticas en posiciones sinónimas con las muteínas IL-2 murinas no presentan actividades similares, y sugieren, por tanto, que los ejemplos de murina no son predictivos de la funcionalidad humana. Los inventores no conocen estudios de las muteínas de IL-2 humanas que comparen las actividades relativas en células humanas que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de IL-2 (por ejemplo, blastos PHA) en relación con las que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$ de IL-2 (por ejemplo, células NK). Se espera que el análisis *in vivo* confirme que las muteínas descritas tendrán un índice terapéutico mejorado sobre IL-2 humana de tipo salvaje mediante la reducción de la toxicidad, proporcionando de esta manera compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento de los trastornos que requieren la estimulación del sistema inmune.

La interleuquina 2 (IL-2) está actualmente en uso clínico para el tratamiento del cáncer renal metastático. Sin embargo, su grave toxicidad ha limitado su uso a únicamente un subconjunto de los pacientes más sanos, y se supone que la toxicidad que limita la dosis compromete su eficacia global. Se ha propuesto que la toxicidad aguda de IL-2 está mediada a través de la activación de las células NK, mientras que la eficacia está mediada a través de la activación directa de las células T (Jacobson, y col., *Proc Natl Acad Sci USA* (Estados Unidos), Sep 17, 1996, **93**(19), p. 10405-10410; Smith KA, *Blood*, 1993, 81(6), p. 1414-1423; Kaplan, y col., *Biotechnology*, **10**(2), p. 157-162). Las células T expresan un receptor diferente para IL-2 del de las células NK (células T: IL-2R $\alpha\beta\gamma$, el receptor IL-2 de alta afinidad; células NK: IL-2R $\beta\gamma$, el receptor IL-2 de afinidad intermedia). Las muteínas de IL-2 humanas descritas en el presente documento activan de manera selectiva el receptor IL-2 de las células T y no el receptor IL-2 de las células NK.

Se ha utilizado la terapia de dosis baja con IL-2 para evitar la activación de las células NK con cierto éxito (Jacobson, y col. (1996). *Proc Natl Acad Sci USA A* **93**: 10405-10410). Esta estrategia incorpora el concepto de que a dosis bajas de IL-2, únicamente se activará el receptor IL-2 de alta afinidad con la exclusión del receptor IL-2 de afinidad intermedia. La forma del receptor IL-2 de afinidad intermedia, IL-2R $\beta\gamma$, se expresa en las células NK, mientras que las células T expresan la forma de alta afinidad, IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

Sin embargo, los inventores solucionaron el problema de la toxicidad desde un ángulo diferente. Se teorizó la interrupción de las interacciones de IL-2 con IL-2R β y/o IL-2R γ , mediante la modificación apropiada de los restos de unión específica en la superficie de unión de IL-2 para evitar la unión eficaz (y de esta manera la activación) con las células que expresan únicamente IL-2R $\beta\gamma$. Sin embargo, en las células que expresan IL-2R $\alpha\beta\gamma$, se producirá la unión inicial con IL-2R α , y de esta manera, la unión con la célula, y de tal manera, la terapia de dosis baja sugerida por Jacobs y col., puede manifestar todavía efectos secundarios tóxicos. En virtud de la unión con IL-2R α , se puede producir el reclutamiento eficaz de IL-2R β e IL-2R γ en la superficie de las células a pesar de las interacciones desequilibradas de la IL-2 modificada con IL-2R β y/o IL-2R γ . Se puede formar de esta manera un complejo IL-2/ IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de señalización competente. Se cree que un variante de IL-2 capaz de activar de manera selectiva los receptores IL-2 de alta afinidad en las células T con preferencia, frente a los receptores IL-2 de afinidad intermedia en las células NK puede tener un índice terapéutico aumentado sobre IL-2 de tipo salvaje debido a un perfil de toxicidad reducido. Un variante IL-2 con un índice terapéutico aumentado podría tener un intervalo de uso significativamente expandido en el tratamiento del cáncer (como terapia directa y/o adjunta) y la inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH y tuberculosis). Otros usos potenciales de IL-2 se derivan de su actividad inmunoestimuladora, e incluyen además el tratamiento directo del cáncer, la inmunodeficiencia, tal como pacientes VIH o SCID humano; enfermedad infecciosa, tal como tuberculosis; como un adyuvante en estrategias de "vacuna del cáncer"; y para las indicaciones de estimulación del sistema inmune, tales como la mejora de los protocolos de vacunación convencionales o para el tratamiento de los ancianos.

La sustitución apropiada en Asp-20, Asn-88, o Gln-126 redujo las interacciones de unión para IL-2R β (Asp-20 y Asn-88) o IL-2R γ (Gln-126). El efecto neto de dichas sustituciones dio como resultado muteínas de IL-2 que mantuvieron la actividad en células T humanas, y tienen actividad reducida en células NK humanas.

Como no fue posible predecir el resultado de una sustitución dada antes de la evaluación en los ensayos de células T y NK, todas las sustituciones posibles de aminoácidos naturales (excepto Cys) se hicieron en las posiciones Asp-20, Asn-88 y Gln-126, y un limitado pero diverso conjunto de mutaciones se hicieron en la posición Asp-84 para ensayar si interaccionaban por tanto con IL-2R β . Podrían ensayarse mutaciones adicionales en la posición Asp-84 si se observaron efectos sobre las interacciones IL-2R β aparentes. Se presentan en la Tabla 1, más abajo, los datos para cuarenta y seis sustituciones distintas en aquellas posiciones.

Se introdujeron las mutaciones usando mutagénesis dirigida a sitio en el ADNc de IL-2 humana de tipo salvaje. Se subclonaron los clones correctos en un vector de expresión adecuado para la expresión en un sistema heterólogo (por ejemplo, *E. coli*, baculovirus, células de levadura o mamífero tales como, por ejemplo, células de Ovario de Hámster Chino (CHO)). Se ensayaron las proteínas purificadas en ensayos de proliferación de células T (Blasto PHA) y proliferación de células NK. Las diferentes respuestas generadas entre estos ensayos por las muteínas individuales, es decir, DE₅₀, indican mutaciones que efectúan estas actividades. De manera específica, las muteínas que estimulan una respuesta relativamente fuerte en el ensayo de los blastos PHA (células T) (frente a la IL-2 de tipo salvaje) en comparación con la respuesta en el ensayo de células NK (frente a la IL-2 de tipo salvaje) sugerirán sustituciones que proporcionen especificidad celular basada en la capacidad de las muteínas específicas para unirse y activar el IL-2R $\alpha\beta\gamma$ expresado en estas células, pero incapaces de unirse, y de esta manera no activar, las células que expresan únicamente IL-2R $\beta\gamma$. Las muteínas de IL-2 que presentan esta propiedad poseerán de esta manera las propiedades inmunoestimuladoras *in vivo* de IL-2 con la toxicidades asociadas a la terapia de IL-2 de pérdida vascular e hipotensión reducidas.

B. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "IL-2 de tipo salvaje" significa IL-2, ya sea nativa o recombinante, que tienen la secuencia de 133 aminoácidos que se producen normalmente en la IL-2 humana nativa (menos el péptido señal, constituido por 20 aminoácidos N-terminales adicionales), cuya secuencia de aminoácidos se describe en Fujita, y col., *PNAS USA*, **80**, 7437-7441 (1983), con o sin una Metionina N-terminal adicional, que se incluye de manera necesaria cuando se expresa la proteína como una fracción intracelular en *E. coli*.

ES 2 281 175 T3

Tal como se usa en el presente documento, “muteína de IL-2” significa un polipéptido en el que se han hecho las sustituciones específicas en la proteína de interleuquina-2 madura humana. La Tabla 1, más abajo, describe las 46 sustituciones individuales de muteínas de IL-2 hechas, y sus correspondientes datos de actividad relativa. Las formas de realización preferidas incluyen aquellas muteínas que tienen al menos 100 veces de actividad relativa. Las formas de realización particularmente preferidas incluyen las siguientes, que presentan una actividad relativa mayor de 100 veces: resto (D) aspartato (Asp) en la posición 20 (“D20”), cuando se nombra de acuerdo con IL-2 de tipo salvaje, está sustituida por isoleucina, (“D20I”) o Histidina (“D20H”); el resto asparagina (Asn) en la posición 88 (N88), ha sido sustituido por Isoleucina (N88I), Glicina (N88G), o Arginina (N88R); y el resto glutamina (Gln) en la posición 126 (Q126) ha sido sustituido por Leucina (Q126L) o Glutamato (Q126E) o aspartato (Q126D). Las muteínas de IL-2 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la IL-2 de tipo salvaje, en los otros restos no sustituidos. Sin embargo, las muteínas de IL-2 de esta invención se caracterizan también por inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios en o en los otros restos de la cadena del polipéptido IL-2 nativo. De acuerdo con esta invención, cualquiera de dichas inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones pueden dar como resultado una muteína de IL-2 que retiene una actividad selectiva de los blastos PHA a la vez que tiene una capacidad reducida para activar las células NK, y entra dentro del alcance de esta patente.

Combinar las sustituciones preferidas o particularmente preferidas descritas anteriormente en una única molécula IL-2 recombinante puede dar como resultado combinaciones mutantes que tienen actividad similar a la descrita en el presente documento para los mutantes únicos. Por ejemplo, se puede esperar que una molécula de IL-2 que tiene una combinación de dos o más mutaciones seleccionadas de la Tabla 1 puede dar como resultado un agonista de IL-2 selectivo de Células T con actividad relativa similar a la actividad relativa de las sustituciones únicas descritas en el presente documento. Las combinaciones mutantes entran dentro del espíritu y el alcance de la presente invención.

Se prefieren las modificaciones y sustituciones conservadoras y otras posiciones de IL-2 (es decir, aquellas que tienen un efecto mínimo sobre la estructura secundaria o terciaria de la muteína). Dichas sustituciones conservadoras incluyen aquellas descritas por Dayhoff en *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5 (1978), y por Argos en EMBO J., 8:779-785 (1989). Por ejemplo, los aminoácidos que comienzan con uno de los siguientes grupos representan cambios conservadores:

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

Se prefieren también las modificaciones o sustituciones que no introducen sitios para entrecruzamientos intermoleculares adicionales o formación de enlaces disulfuro incorrectos. Por ejemplo, se sabe que IL-2 tiene tres restos cys, en las posiciones 58, 105 y 125 de la secuencia madura de tipo salvaje.

De esta manera la presente invención se refiere a

Una muteína de IL-2 humana numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje que tiene una sustitución de aminoácido en una de las posiciones 20, 88, y 126 en la que la sustitución en la posición 20 no incluye arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, treonina, o triptófano; la sustitución en la posición 88 no incluye asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, triptófano, o prolina; la sustitución en la posición 126, no incluye ácido aspártico, alanina, histidina, triptófano, cisteína, glutamina, ácido glutámico, o lisina; y por tanto, dicha muteína de IL-2 activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

Se prefiere una muteína de IL-2, en la que la posición 20 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: alanina, histidina, isoleucina, metionina, glutamina, serina, valina, y tirosina, y por tanto, dicha muteína activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

También se prefiere una muteína de IL-2, en la que la posición 88 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: alanina, arginina, ácido glutámico, histidina, lisina, leucina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, serina, treonina, tirosina, y valina, por tanto, dicha muteína activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

Más preferida es una muteína de IL-2, en la que la posición 88 está sustituida por arginina. También se prefiere una muteína de IL-2, en la que la posición 126 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: asparagina, leucina, prolina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, arginina, serina, treonina, tirosina, y valina, por tanto, dicha muteína activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico y la muteína de IL-2 humana tal como se ha definido anteriormente, por la que, dicha composición activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

- 5 La invención se refiere de manera adicional a la muteína de IL-2 humana numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje que tiene sustituciones en dos de las posiciones 20, 88, y 126, en la que dicha sustitución en la posición 20 no incluye arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, treonina, o triptófano; dicha sustitución en la posición 88 no incluye asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, triptófano, o prolina; y dicha sustitución en la posición 126 no incluye ácido aspártico, alanina, histidina, triptófano, cisteína, glutamina, ácido glutámico, o lisina; y por tanto, dicha muteína de IL-2 activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

- 15 La invención incluye de manera adicional un polinucleótido que comprende una secuencia de ADN que codifica la muteína de IL-2 tal como se ha definido anteriormente, un vector que comprende el polinucleótido y una célula eucariota aislada transformada con dicho polinucleótido y también una célula procariota transformada con dicho polinucleótido.

- 20 “Numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje” significa identificar un aminoácido escogido con referencia a la posición en la que se produce normalmente el aminoácido en la secuencia madura de la IL-2 de tipo salvaje. Cuando se hacen inserciones o deleciones en la muteína de IL-2, una persona experta en la técnica apreciará que la Asp que se produce normalmente en la posición 20 puede cambiarse de posición en la muteína. Sin embargo, puede determinarse fácilmente la localización de la Asp cambiada mediante inspección y correlación de los aminoácidos flanqueantes con aquellos flanqueantes de Asp en la IL-2 de tipo salvaje.

- 25 La expresión “tipos de células que tienen el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ” significa las células conocidas por tener este tipo de receptor, es decir, las células T, las células T activadas, las células B, los monocitos activados, y las células NK activadas. La expresión “tipos de células que tienen el receptor IL-2R $\beta\gamma$ ” significa las células conocidas que tienen este tipo de receptor, es decir, las células B, los monocitos restantes, y las células NK restantes.

- 30 Se pueden producir las muteínas de IL-2 de la presente invención mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Dichos procedimientos incluyen construir una secuencia de ADN que codifica las muteínas de IL-2 de esta invención y expresar aquellas secuencias en un huésped transformado adecuado. El procedimiento producirá las muteínas recombinantes de esta invención. Sin embargo, se pueden producir también las muteínas de esta invención, no obstante de forma menos preferible, mediante síntesis química o una combinación de síntesis química y tecnología de ADN recombinante. Los procedimientos de producción discontinua o producción mediante perfusión están generalmente comprendidos entre las habilidades de la técnica. Véase Freshey, R. I (ed), “Animal Cell Culture: A Practical Approach 2^a ed., 1992, IRL Press, Oxford, Inglaterra; Mather, J. P. “Laboratory Scale up of Cell Cultures (0,5-50 liters)”, *Methods Cell Biology*, **57**:219-527 (1998); Hu, W. S., y Aunins, J. G., “Large-scale Mammalian Cell Culture”, *Curr Opin Biotechnol*, **8**:148-153 (1997); Konstantinov, K. B., Tsai, Y., Moles, D., Matanguihan, R., 40 “Control of long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat”, *Biotechnol Prog*, **12**:100-109 (1996).

- En una forma de realización de un procedimiento recombinante para producir una muteína de esta invención se construyó una secuencia de ADN aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica la IL-2 de tipo salvaje y cambiando a continuación el codón para Asp20 por un codón para isoleucina (I) mediante mutagénesis dirigida a sitio. Esta técnica es bien conocida. Véase, por ejemplo, *Mark y col.*, “Site-specific Mutagénesis Of The Human Fibroblast Interferon Gene”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, pp. 5662-66 (1984); y la Patente de los Estados Unidos N° 4.588.585, incorporada en el presente documento por referencia.

- 50 Otro procedimiento para construir una secuencia de ADN que codifique las muteínas IL-12 de esta invención podría ser la síntesis química. Esta incluye por ejemplo la síntesis directa de un péptido, mediante medios químicos, de la secuencia de proteína que codifica una muteína de IL-2 que presenta las propiedades descritas en la invención. Este procedimiento puede incorporar aminoácidos naturales y no naturales en las posiciones que afectan las interacciones de IL-2 con IL-2R β e IL-2R γ . De manera alternativa, se puede sintetizar un gen que codifica la muteína de IL-2 deseada mediante medios químicos usando un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos se diseñan en función de la secuencia de aminoácidos de la proteína IL-2 deseada, y de manera preferible, seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá la muteína recombinante. A este respecto, es bien reconocido que el código genético está degenerado - que un aminoácido puede estar codificado por más de un codón. Por ejemplo, Phe (F) es codificado por dos codones, TTC o TTT, Tyr (Y) es codificado por TAC o TAT e his (H) es codificado por CAC o CAT. Trp (W) es codificado por un codón único, TGG. De acuerdo con esto, se apreciará que para una secuencia de ADN dada que codifica una muteína de IL-2 concreta, existirán muchas secuencias degeneradas de ADN que codificarán esta muteína de IL-2. Por ejemplo, se apreciará que de manera adicional a la secuencia de ADN preferida para la muteína D20I que se muestra en la SEC DE ID N: 1, existirán muchas secuencias de ADN degenerado que codifiquen la muteína de IL-2 que se muestra. Estas secuencias de ADN degenerado se consideran dentro del alcance de esta invención. Por tanto, “variantes degeneradas de la misma” en el contexto de esta invención significa todas las secuencias de ADN que codifican y por tanto permiten la expresión de una muteína concreta.

La secuencia de ADN que codifica la muteína de IL-2 de esta invención, ya se prepare mediante mutagénesis dirigida a sitio, síntesis química u otros procedimientos, puede o no puede incluir también secuencias de ADN que codifican una secuencia señal. Dicha secuencia señal, si está presente, deberá ser una reconocida por la célula escogida para la expresión de la muteína de IL-2. Puede ser procariota, eucariota, o una combinación de las dos. Puede ser también la secuencia señal de la IL-2 nativa. La inclusión de una secuencia señal depende de cómo se desea segregar la muteína de IL-2 a partir de las células recombinantes en las que se fabrica. Si las células que se escogen son procariotas, se prefiere generalmente que la secuencia de ADN no codifique una secuencia señal. Si las células escogidas son eucariotas, se prefiere generalmente que se codifique una secuencia señal y de manera más preferible que la que se use sea la secuencia señal de la IL-2 de tipo salvaje.

Se pueden aplicar procedimientos convencionales para sintetizar un gen que codifica una muteína de IL-2 de acuerdo con esta invención. Por ejemplo, se puede usar la secuencia completa de aminoácidos para construir un gen retrotraducido. Se puede sintetizar un oligómero de ADN que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique la muteína de IL-2. Por ejemplo, se pueden sintetizar diversos oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y a continuación ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente proyecciones 5' o 3' para un ensamblaje complementario.

Una vez ensamblado (mediante síntesis, mutagénesis dirigida a sitio u otro procedimiento), las secuencias de ADN que codifican una muteína de IL-2 de esta invención se insertarán en un vector de expresión y se conectarán de manera operativa con una secuencia control de la expresión apropiada para la expresión de la muteína de IL-2 en el huésped transformado deseado. El ensamblaje apropiado puede ser confirmado por la secuenciación de nucleótidos, el cartografiado de restricción, y la expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen deberá conectarse de manera operativa a las secuencias de control de la expresión transcripcionales y traduccionales que son funcionales en el huésped de expresión escogido.

La elección de la secuencia control de la expresión y el vector de expresión dependerán de la elección del huésped. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para los huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden las secuencias control de la expresión de SV40, el virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para los huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, que incluyen col EI, pCR1, pER32z, pMB9 y sus derivados, plásmidos con una gama de huéspedes más amplia, tales como RP4, ADN de fagos, los numerosos derivados del fago lambda, por ejemplo, NM989, y otros ADN de fagos, tales como M13 y ADN de fagos filamentosos de cadena sencilla. Los vectores de expresión útiles para las células de levadura incluyen el plásmido 2 μ y los derivados del mismo. Los vectores útiles para las células de insecto incluyen pVL 941. Se prefiere pFastBacTM 1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD): Cate y col., "Isolation OF The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression OF The Human Gene In Animal Cells", Cell, **45**, pp. 685-98 (1986).

De manera adicional, se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias control de la expresión en estos vectores. Dichas secuencias control de la expresión útiles incluyen las secuencias control de la expresión asociadas con genes estructurales de los vectores de expresión anteriores. Los ejemplos de las secuencias control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40 o el adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el operador principal y las regiones del promotor del fago lambda, por ejemplo, PL, las regiones control de la proteína de la envuelta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otros enzimas glicolíticos, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, PhoA, los promotores del sistema α -apareado de la levadura, el promotor poliédrico de Baculovirus, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de los genes de las células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

Se puede usar cualquier huésped adecuado para producir las muteínas de IL-2 de esta invención, que incluyen bacterias, hongos (incluyendo levaduras), plantas, insectos, mamíferos, u otras células o líneas celulares animales apropiadas, así como animales no humanos o plantas transgénicas. De manera más particular, estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hogos, levaduras, células de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* (Sf9), células animales tales como células de ovario de hámster Chino (CHO) y células de ratón tales como NS/O, células de mono verde Africano tales como COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 y BNT 10, y células humanas, así como células de plantas en cultivo de tejidos. Para la expresión celular animal, se prefieren las células CHO y células COS 7 en cultivos y particularmente la línea celular de CHO, CHO (DHFR-) o la línea HKB.

Se deberá entender por supuesto que no todos los vectores y las secuencias de control de la expresión funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN descritas en el presente documento. Tampoco todos los huéspedes funcionarían igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, una persona experta en la técnica puede llevar a cabo una selección entre estos vectores, las secuencias control de la expresión y los huéspedes sin experimentación indebida. Por ejemplo, al seleccionar un vector, deberá considerarse el huésped debido a que el vector debe replicarse en él. Deberán considerarse también el número de copias del vector, la capacidad de controlar el número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores de antibióticos. Por ejemplo, los vectores preferidos para uso en esta invención incluyen aquellos que permiten que el ADN codifique las muteínas de IL-2 que se van a amplificar en un número de copias. Se conocen bien en la técnica

dichos vectores amplificables. Incluyen, por ejemplo, los vectores capaces de ser amplificados mediante amplificación DHFR (véase, Kaufman, Patente de los Estados Unidos 4.470.461, Kaufman y Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, pp. 1304-19 (1982)) o amplificación de la glutamina sintetasa ("GS") (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.122.464, y la Solicitud Europea publicada 338.841).

Al seleccionar una secuencia control de la expresión, deberán considerarse también una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa de la secuencia, su controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia de ADN real que codifica la muteína de IL-2 de esta invención, de manera particular con respecto a las estructuras secundarias potenciales. Deberán seleccionarse los huéspedes considerando a su compatibilidad con el vector escogido, la toxicidad del producto codificado por las secuencias de ADN de esta invención, sus características de secreción, su capacidad para plegar los péptidos de manera correcta, sus necesidades de fermentación o cultivo, y la facilidad de purificación de los productos codificados por las secuencias de ADN.

Dentro de estos parámetros, una persona experta en la técnica puede seleccionar diversas combinaciones de vector/secuencia control de la expresión/huésped que expresarán las secuencias de ADN deseado en la fermentación o en cultivos animales a gran escala, usando, por ejemplo, células CHO o COS 7.

Las muteínas de IL-2 obtenidas de acuerdo con la presente invención pueden ser glicosiladas o no glicosiladas dependiendo del organismo huésped usado para producir la muteína. Si se eligen bacterias elegidas como huésped, entonces, la muteína de IL-2 producida no se glicosilará. Las células eucariotas, por otra parte, glicosilarán las muteínas de IL-2, aunque quizás no de la misma forma en la que se glicosila la IL-2 nativa. Se puede purificar la muteína de IL-2 producida por el huésped transformado de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado. Se conocen diversos procedimientos para purificar IL-2. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Protein Science*, Vol 2. Eds: John E. Coligan, Ben M. Duna, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, Unidad 6,5 (Copyright 1997, John Wiley and Sons, Inc). Se prefiere volver a plegar a partir de los cuerpos de inclusión generados en *E. coli*, o a partir del medio condicionado de cultivos de mamífero o levadura que producen una muteína dada usando intercambio catiónico, filtración en gel, y o cromatografía líquida en fase inversa. Véase los Ejemplos 1 (*E. coli*) y 10 (perfusión de células CHO) a continuación.

Se puede evaluar la actividad biológica de las muteínas de IL-2 de esta invención por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Dichos ensayos incluyen proliferación de blastos PHA y proliferación de células NK. Se confirmarán las muteínas de actividad apropiada, es decir, completamente activas en IL-2R $\alpha\beta\gamma$, con actividad reducida en células que portan IL-2R $\beta\gamma$, usando los dos ensayos. La "actividad relativa" de una muteína se mide con respecto a la IL-2 de tipo salvaje, y como se describe de manera adicional en los ejemplos, es la relación de la actividad de proliferación de los blastos PHA a la proliferación de las células NK.

La muteína de IL-2 de esta invención se administrará a una dosis aproximadamente paralela que o mayor que la empleada en terapia con la IL-2 nativa de tipo salvaje o recombinante. Se administra de manera preferible una cantidad eficaz de la muteína de IL-2. Una "cantidad eficaz" significa una cantidad capaz de prevenir o disminuir la gravedad o propagación de la dolencia o indicación que está siendo tratada. Será evidente para aquellas personas expertas en la técnica que la cantidad eficaz de muteína de IL-2 dependerá, *inter alia*, de la enfermedad, la dosis, el calendario de administración de la muteína de IL-2, si la muteína de IL-2 se administra sola o en conjunción con otros agentes terapéuticos, la semivida en suero de la composición, y la salud general del paciente.

La muteína de IL-2 se administra de manera preferible en una composición que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo que no produce ningún efecto desfavorable en los pacientes a los que se administra. Se conocen bien en la técnica dichos vehículos farmacéuticamente aceptables. Se prefiere HSA al 2%/PBS a pH 7,0.

Se pueden formular las muteínas de IL-2 de la presente invención en composiciones farmacéuticas mediante procedimientos bien conocidos. Véase, por ejemplo, Remington's pharmaceutical Science por E. W. Martin, incorporada en el presente documento por referencia, que describe las formulaciones adecuadas. Se puede formular la composición farmacéutica de la muteína de IL-2 en una variedad de formas, que incluyen la líquida, en gel, liofilizada, o cualquier otra forma adecuada. La forma preferida dependerá de la indicación concreta que está siendo tratada y será evidente para una persona experta en la técnica.

Se puede administrar la composición farmacéutica de la muteína de IL-2 por vía oral, por aerosol, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, o subcutánea o en cualquier otra manera aceptable. La vía de administración preferida dependerá de la indicación concreta que está siendo tratada y será evidente para una persona experta en la técnica. Se puede administrar la composición farmacéutica de la muteína de IL-2 en conjunción con otros agentes terapéuticos. Se pueden incorporar estos agentes como parte de la misma composición farmacéutica o se pueden administrar de manera separada de la muteína de IL-2, bien de manera concurrente o de acuerdo con cualquier otro calendario de tratamiento aceptable. De manera adicional, se puede usar la composición farmacéutica de la muteína de IL-2 como un adjunto a otras terapias.

De acuerdo con esto, esta invención proporciona composiciones y procedimientos para el tratamiento del VIH, Cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa, adyuvante de la vacuna en la vacuna del Cáncer y terapia

de vacuna convencional, para la estimulación inmune en los ancianos u otros individuos inmunocomprometidos, así como en pacientes con SCID humanos, u otra aplicación terapéutica que requiera la estimulación general del sistema inmune en cualquier animal adecuada, de manera preferible un mamífero, de manera más preferible un ser humano. Como se ha señalado anteriormente en la sección de Antecedentes, IL-2 tiene muchos efectos. Algunos de estos son la estimulación de los blastos PHA, las células T latentes, las células B, los monocitos, y las células NK, etc.; las muteínas descritas en el presente documento tendrán actividades en los tipos de células que expresan únicamente el receptor IL-2 de alta afinidad, tal como las células T latentes, pero no el receptor IL-2 de afinidad intermedia, tales como células NK o monocitos.

También se contempla el uso de las secuencias de ADN que codifican las muteínas de IL-2 de esta invención en aplicaciones de terapia génica. Las aplicaciones de terapia génica contempladas incluyen el tratamiento de aquellas enfermedades en las que se espera que IL-2 proporcione una terapia eficaz debido a su actividad de células T, por ejemplo, HIV, Cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa, adyuvante de la vacuna en la vacuna del cáncer y terapia de vacuna convencional, para la inmunoestimulación en los ancianos o inmunocomprometidos de cualquier otra manera, así como en pacientes con SCID humanos, y en enfermedades que responden de cualquier otra forma a IL-2 o los agentes infecciosos sensibles a la respuesta inmune mediada por IL-2.

La liberación local de muteínas de IL-2 usando terapia génica puede proporcionar el agente terapéutico al área diana. Se contemplan metodologías de terapia génica *in vitro* e *in vivo*. Se conocen diversos procedimientos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Véase, por ejemplo, Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", *Science*, **260**:926-31 (1993); Estos procedimientos incluyen:

1) Transferencia directa del gen. Véase, por ejemplo, Wolff y col., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle *In Vivo*", *Science*, **247**: 1465-68 (1990);

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Véase, por ejemplo, Caplen y col., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", *Nature Med.*, **3**: 39-46 (1995); Crystal, "The Gene As A Drug", *Nature Med.*, **1**: 25-17 (1995); Gao y Huang; "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **179**:280-85 (1991);

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Véase, por ejemplo, Kay y col., "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", *Science*, **262**: 117-119 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", *Science*, **256**:808-813 (1992)

4) Transferencia de ADN mediada por virus. Dichos virus de ADN incluyen adenovirus (de manera preferible, vectores basados en Ad-2 o Ad-5), herpes virus (de manera preferible, vectores basados en el virus del herpes simplex), y parvovirus (de manera preferible, vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no autónomos, de manera más preferible, vectores basados en virus adeno-asociados, lo más preferible, vectores basados en AAV-2). Véase, por ejemplo, Ali y col., "The USE OF DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", *Gene Therapy*, **1**: 367-84 (1994); Patente de los Estados Unidos 4.797.368 incorporada en el presente documento como referencia, y patente de los Estados Unidos 5.139.941, incorporada en el presente documento como referencia.

La elección de un sistema vector particular para transferir el gen de interés dependerá de una variedad de factores. Un factor importante es la naturaleza de la población de células diana. Aunque se han estudiado y usado de manera extensiva los vectores retrovíricos en numerosas aplicaciones de terapia génica, estos vectores son generalmente inadecuados para infectar las células que no se dividen. De manera adicional, los retrovirus tienen el potencial de la oncogenicidad.

Los adenovirus tienen la ventaja de que tienen un amplio intervalo de huéspedes, puede infectar células inactivas o terminalmente diferenciadas, tales como neuronas o hepatocitos, y parecen esencialmente no oncogénicos. Véase, por ejemplo, Ali y col., *más arriba*, p. 367. Los adenovirus no parecen integrarse en el genoma huésped. Debido a que existen extracromosómicamente, el riesgo de mutagénesis insercional está muy reducido. Ali y col., *más arriba*, p.373.

Los virus adeno-asociados presentan ventajas similares a los vectores basados en adenovirus. Sin embargo, los AAV presentan integración específica de sitio en el cromosoma humano 19. Ali y col., *más arriba*, p. 377.

Puede usarse el ADN que codifica la muteína de IL-2 de esta invención en terapia génica para enfermedades de inmunodeficiencia tales como VIH; enfermedades infecciosas tales como tuberculosis; y cánceres, tales como carcinoma renal.

De acuerdo con esto, se proporciona la terapia génica con ADN que codifica las muteínas de IL-2 de esta invención a un paciente en necesidad de la misma, concurrente con, o de manera inmediata tras el diagnóstico.

Esta solución tiene la ventaja de la actividad selectiva de las muteínas de IL-2 de esta invención para prevenir la toxicidad indeseada y los acontecimientos adversos. El técnico experto apreciará que se puede usar cualquier vector de terapia génica adecuado que contenga el ADN de la muteína de IL-2 de acuerdo con esta forma de realización. Se conocen las técnicas para construir dicho vector. Véase, por ejemplo, Anderson, W. F., Human Gene Therapy, *Nature*, **392**, 25-30 (1998); Verma, I. M., y Somia, N., Gene Therapy - Promises, Problems, and Prospects, *Nature*, **389**, 239-

242 1998). Se puede llevar a cabo la introducción del vector que contiene el ADN de la muteína de IL-2 en el sitio diana usando técnicas conocidas.

C. Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de muteínas en E. coli

Se generaron las muteínas mediante mutagénesis dirigida a sitio usando cebadores que contenían los codones correspondientes a la mutación deseada esencialmente tal como se describe por Kunkel TA, Roberts JD, y Zakour RA, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" (1987), *Methods Enzymol* **154**: 367-382. De manera breve, se subclonó el ADNc de la IL-2 humana que contiene los sitios de los enzimas de restricción Bam HI y Xba I en el vector M13 mp19 del fago M13 (New England Biolabs, Beverly, MA) usando los mismos sitios. Se obtuvo el ADNc de la IL-2 de tipo salvaje usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa ("PCR") a partir de una agrupación de ADNc generada a partir del ARNm aislado de linfocitos de sangre periférica humana inducidos 24 horas con 12-miristato 13-acetato de forbol (10 ng/ml): Los cebadores PCR usados fueron, para el extremo 5' del marco de lectura abierto de IL-2,

5'-CCT CAA CTC CTG AAT TCA TGT ACA GGA TGC-3' (SEC DE ID N°: 3);

Y para el extremo 3' del marco de lectura abierto de IL-2

5'-GGA AGC GGA TCC TTA TCA AGT CAG TGT TGA G-3' (SEC DE ID N°: 4).

Se incorporaron los sitios de los enzimas de restricción *Eco* RI (extremo 5') y *Bam* HI (extremo 3') en cada oligonucleótido y se indicaron por cursiva. Las condiciones PCR usadas fueron 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58,7°C, y 1 minuto a 72°C durante 25 ciclos. Se confirmó la secuencia de ADNc de IL-2 obtenida de esta manera mediante secuenciación usando el kit de secuenciación Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) tal como describe el fabricante. Se obtuvo una cadena de ADN sencilla que contenía uracilo (U-ADN) transformando la cepa de *E. coli* CJ236 (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA) con ADNc de IL-2 que contenía M13 mp19. Se utilizó la mutagénesis dirigida a sitio en los cebadores generales que contenían 15 nucleótidos homólogos al molde de U-ADN 5' en el(los) codón(es) diana para la mutagénesis, los nucleótidos que incorporan el cambio deseado, y 10 nucleótidos adicionales homólogos al molde de U-ADN-3' del último nucleótido alterado. En primer lugar, se usó la mutagénesis dirigida a sitio para introducir un sitio de restricción *Nco* I en el inicio de la secuencia madura de la IL-2 humana. El uso de este sitio de restricción incorpora un resto metionina N-terminal que dirigirá la expresión en el espacio citoplásmico de *E. coli* usando por ejemplo, el vector de expresión pET3d. El cebador usado para este objetivo fue:

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

Los cebadores específicos usados para incorporar las mutaciones en las posiciones D20, N88, y Q126 fueron:

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

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

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

en los que NNN se sustituyó por un codón apropiado para la Histidina (CAC) o Isoleucina (ATC) (en la posición D20), arginina (CTG), glicina (GGY), o isoleucina (ATC) (en la posición N88), o leucina (CTG) (en la posición Q126). Otras mutaciones utilizaron una estrategia similar y un codón apropiado para una mutación dada. Se fosforilaron los cebadores usando T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs, Beverly, MA) usando el protocolo del fabricante. Tras reasociar el cebador al molde de U-ADN y extender la T7 ADN polimerasa (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA), se transformaron las células de la cepa DH5αTM de *E. coli* (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) con 5 µl de la mezcla de reacción y se colocaron en placas en medio LB que contenía agar al 0,7%. Tras la incubación a 37°C, se expandieron las placas escogiendo una placa única y trasladándola a 2 ml de medio LB y se cultivaron durante la noche a 37°C. Se aisló el ADN de cadena sencilla usando un kit de purificación M13 (Quiagen, Inc., Chatsworth, CA) según el protocolo del fabricante, y se identificaron los clones que contenían la mutación deseada secuenciando el ADN de cadena sencilla usando el kit de secuenciación Sequenase® (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) según el protocolo del fabricante. Se aisló el ADN de la Forma Replicativa del ADNc de la muteína de IL-2 que correspondía a las placas que contenían la secuencia mutada correcta usando *Nco*I y *Xba*I, y se subclonaron en el vector plásmido pET3a (Stratagene, San Diego, CA) (Strat). Se transformó la cepa BL21 de *E. coli* con el vector pET3a que contenía la muteína, y se hizo crecer hasta un ABS₂₈₀ de entre 0,60 y 1,0, en cuyo momento se añadió IPTG 0,4 mM para inducir la producción de muteína de IL-2.

Ejemplo 2

Extracción y purificación de muteínas de IL-2 de E. coli

5 Se cosecharon las células tres horas después de la inducción mediante centrifugación a 10.000 X g. Se renaturalizaron y purificaron las muteínas de IL-2 recombinantes dispersando en primer lugar las células en 10 volúmenes (vol./masa húmeda) de tampón de sacarosa/Tris/EDTA sacarosa 0,375 M, Tris/HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Se sonicaron las células dispersadas 3 veces a 300 w con intervalos de descanso de 30 segundos en un baño de hielo, usando un sonicador Missonix modelo XL2020 equipado con una sonda convencional de 1 pulgada (2,54 cm). A continuación se centrifugó el material sonicado a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Se lavó el sedimento, que debería ser de color blanco en este punto, mediante resuspensión y centrifugación una vez en tampón de sacarosa/Tris/EDTA, dos veces con tampón Tris/EDTA (Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), y finalmente se resuspendió en 10 volúmenes de Tampón Tris/HCl 0, 1 M, pH 8,0 (se toma la muestra en este punto para el análisis del gel) y se centrifugó durante 20 minutos a 17.000 x g.

15 Se disolvió el sedimento añadiendo 3 volúmenes de cloruro de guanidinio 8 M en Tris 01 M/HCl (pH 8,0) y 2-mercaptoetanol al 0,1% (vol/vol). Tras la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 17.000 x g. Se dializó la solución resultante durante aproximadamente 20 horas frente a 20 volúmenes de Tris/CCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM a 4°C. Se centrifugó la solución a 17.000 x g durante 20 minutos, se ajustó con ácido trifluoroacético al 0,1%, y se filtró en una unidad de filtrado de 0,22 micrómetros. Se transfirió la solución de manera inmediata a una botella siliconizada y se cargó sobre una columna C8 (Vydac 208TP54). Se purificaron las muteínas de IL-2 usando un gradiente lineal de 20 minutos usando acetonitrilo al 40-85% en TFA al 0,1%. Se determinó la concentración de la proteína eluida mediante A280 y análisis de aminoácidos. A continuación se introdujeron partes alícuotas de proteína en tubos siliconizados (100 mL) y se almacenó a -20°. La muteína purificada de esta manera fue típicamente una banda única tal como se observó mediante SDS-PAGE (tinción de plata), y se cuantificó mediante el análisis de aminoácidos (precisión típica > 90%).

Ejemplo 3

Ensayo de proliferación de células T

30 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de aproximadamente 100 mL de sangre humana normal (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, CA), se diluyeron en 1:2 de solución salina tamponada con sulfato de Dulbecco fría (libre de Ca²⁺ y Mg²⁺; DPBS). Se colocó una capa inferior de Ficoll - Paque (Pharmacia) y se centrifugó la muestra para aislar las PBMC, seguido por lavados a fondo en DPBS frío. Se generaron los blastos PHA (células T activadas) volviendo a suspender la células en RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10% (Hyclone), al cual se añadió un 1% (p/v) de cada uno de los siguientes: L-glutamina; aminoácidos no esenciales; piruvato de sodio, y antibiótico-antimicótico (medio RPMI) en una densidad de 1 x 10⁶ células/ml. Se añadió fitohemaglutanina (PHA-P; Sigma) a una concentración final de 10 µg/ml, y se incubaron las células a 37°C, CO₂ al 5% durante 3 días. Se cosecharon las células y se lavaron dos veces en DPBS, se volvieron a suspender en medio RPMI y se colocaron en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 1 X 10⁵ células/pocillo en 200 µl con concentraciones variables de IL-2 o muteína en medio RPMI. Se incubaron las placas durante 48 h a 37°C, se pulsaron con 1 µCi de ³H-timidina (DuPont NEN®, Boston, MA)/pocillo durante 6 h, se cosecharon, y se midió la radiactividad tras cosechar las células sobre filtros de fibra de cristal.

Ejemplo 4

Ensayo de proliferación de células NK

50 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de aproximadamente 100 mL de sangre humana normal (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, Ca) diluidas 1:2 de solución salina tamponada con sulfato de Dulbecco fría (libre de Ca²⁺ y Mg²⁺; DPBS). Se colocó una capa inferior de Ficoll - Paque (Pharmacia) y se centrifugó la muestra para aislar las PBMC, seguido por lavados a fondo en DPBS frío. Se separaron las células NK de las otras células. El kit de aislamiento de células NK Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania; cat n° 465-01) es el preferido para este objetivo. El kit está constituido por dos reactivos, columnas de separación y un soporte de columna magnética muy poderoso. El primer reactivo es un cóctel de anticuerpos monoclonales CD3, CD4, CD19, CD33 conjugados con hapteno del isótopo IgG1 de ratón. Esto es para separar las PBMC de las células T, las células B y las células mieloides. Se prevé que se pueda usar cualquier conjunto adecuado de anticuerpos que reconozca estos tipos de células. El segundo reactivo está constituido por micropérlas MAC súper-paramagnéticas coloidales conjugadas con un anticuerpo anti-hapteno. se volvieron a suspender las células en PBS con albúmina de suero bovino al 0,5% y EDTA 2 mM (PBS/EDTA). El volumen de la suspensión es dependiente del número de células usadas y se proporciona en una tabla por Miltenyi Biotec. Normalmente, con un número de células de 2 a 5 x 10⁸ PBMC, se vuelven a suspender las células en 800 µL del tampón y a continuación se usan 200 µL de cada reactivo. Tras la incubación con los reactivos, se añadieron las células a la columna (se volvieron a suspender en 2 mL de tampón): Las células no-NK se adhieren al imán (se separaron) y se aislaron y recogieron las células NK en el flujo que atraviesa la columna. Se lavaron las células, se volvieron a suspender en medio RPMI (contiene: RPMI 1640, al cual se añadió un

ES 2 281 175 T3

1% de cada uno de los siguientes: L-glutamina; aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio; antibiótico-antimicótico (todos de Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), suero bovino fetal al 10% (Hyclone)), y se colocaron en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en 200 μ l. Se cosecharon las células y se lavaron dos veces en DPBS, se volvieron a suspender en medio RPMI y se colocaron en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en 200 μ l con concentraciones variables de IL-2 o muteína en medio RPMI. Se incubaron las placas durante 48 h a 37°C, se pulsaron con 1 μ Ci de 3 H-timidina (DuPont NEN[®], Boston, MA)/pocillo durante 6 h, se cosecharon y se midió la radiactividad tras cosechar las células sobre filtros de fibra de vidrio.

10 Ejemplo 5

Muteínas que activan de manera selectiva las células T sobre las células NK

Se generaron las muteínas usando la mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel y col (1987), Methods Enzymol, 154: 367-382) en las posiciones Asp-20, Asp-84, Asn-88, y Gln-126, y se expresaron en *E. coli* usando el sistema de expresión pET-3A tal como se describe por el fabricante (Stratagene). Se purificaron las muteínas mediante la recuperación de los cuerpos de inclusión en guanidina-HCl, se volvieron a plegar, y se cromatografiaron usando HPLC, tal como se ha descrito anteriormente. La proteína resultante apareció con > de un 95% de pureza mediante la SDS-PAGE teñida con plata, y se analizó para la concentración y pureza mediante el análisis de aminoácidos (precisiones de AAA normalmente > del 90%). Se confirmaron las muteínas que tenían actividad apropiada en la secuencia usando un análisis de espectrometría de masas. Se evaluaron las muteínas purificadas de esta manera en los ensayos de células T y NK anteriormente descritos. Se indican en la Tabla 1 las actividades relativas de las muteínas de IL-2 en los ensayos de células T y NK.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 281 175 T3

TABLA 1

Muteínas evaluadas respecto de la actividad selectiva de la células T

Muteína	Actividad relativa		Actividad relativa
	Células T frente a NK	Células T	Células NK
IL-2 de tipo salvaje	1	1,00000	1,00000
Muteínas D20			
D20A	5	0,00024	0,00005
D20H	3900	0,37081	0,00009
D20I	7600	4,59635	0,00061
D20K	330	0,06301	0,00019
D20L	100	0,00063	0,00001
D20M	490	0,05372	0,00011
D20N	160	0,03000	0,00019
D20Q	100	0,03180	0,00032
D20R	33	0,00018	0,00001
D20S	170	0,06640	0,00038
D20T	1	1,00000	1,00000
D20V	10	0,00093	0,00009
D20Y	1000	0,06587	0,00007
Muteínas N88			
N88A	50	0,50000	0,01
N88E	10	0,01172	0,00115
N88F	22	0,02222	0,001
N88G	980	8,33333	0,00853
N88H	3	0,00100	0,001
N88I	9600	0,98074	0,00010
N88K	3	0,00010	0,00032
N88L	4	0,00400	0,001
N88M	250	0,25000	0,001
N88R	6200	0,89730	0,00015
N88S	80	0,00200	0,16000
N88T	395	0,50000	0,001266
N88V	67	0,06670	0,001
N88W	1	0,001000	0,001
N88Y	8	0,00800	0,001
Muteínas Q126			
Q126A	0,30	0,01743	0,05809
Q126D	240	0,14630	0,00061
Q126E	400	10,0000	0,02500
Q126F	32	0,87358	0,02749
Q126G	100	0,55556	0,00556
Q126H	0,03	0,02216	0,73875
Q126I	33	0,00100	0,00003
Q126K	1,0	1,00000	1,00000
Q126L	680	3,06186	0,00447
Q126M	9,1	19,94092	2,19298
Q126N	10	6,57895	0,64993
Q126P	3,0	0,00032	0,00011
Q126R	11	4,02695	0,36392
Q126S	33	0,03417	0,00103
Q126T	3,3	0,00010	0,00003
Q126V	330	1,00556	0,00302
Q126W	1,0	0,20000	0,20000
Q126Y	10,0	0,88500	0,08850

Se describen las actividades de las muteínas en términos de concentración relativa de muteína necesaria para proporcionar una respuesta máxima del 50% (DE_{50}) en comparación con la DE_{50} de la IL-2 de tipo salvaje en el mismo ensayo; en el caso de ensayos múltiples sobre la misma muteína, se relaciona la media geométrica de los valores. Los valores DE_{50} para la IL-2 de tipo salvaje oscilan entre aproximadamente 10 pM y 150 pM en el ensayo de células T, y aproximadamente 50 pM y aproximadamente 200 pM en el ensayo de células NK. La relación de la actividad de las muteínas de las células T frente a las células NK se expresa como actividad relativa de la muteína en las células T dividida entre la actividad relativa de la muteína sobre las células NK. Se determina esta relación para cada muteína usando únicamente la actividad determinada a partir de ensayos dados de células T y NK usando células a partir de un donante único.

Se pueden clasificar las actividades de las muteínas en 6 amplias categorías: 1) selectividad de 1000 veces de las células T; 2) selectividad entre 100 pero < de 1000 veces de las células T; 3) selectividad entre 10 pero < de 100 veces de las células T; 4) actividad mejorada en relación con IL-2 en las células T; 5) selectividad de las células NK; 6) selectividad de 10 veces para cualquiera de las células T o NK.

Clase 1: D20H, I e Y; N88G, I, y R.

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

Clase 3: D20R; N88A, E, F, S, y V; Q126F, I, N, R y S.

Clase 4: D20I; N88G; Q126E, L, M, N, y R.

Clase 5: Q126A, H.

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

Dentro de las clases 1-3, las muteínas preferidas son aquellas que presentan actividad casi IL-2 de tipo salvaje o mejor en las células T. En la Clase 1, éstas incluyen D20H e I; N88G, I, y R; en la Clase 2, estas incluyen N88M y T, Q126D, E, G, L, y V; en la Clase 3, estas incluyen N88A, Q126F y G. Se predice que las muteínas de la Clase 4 tienen mayor potencia que la IL-2 de tipo salvaje *in vivo*.

Se puede ver a partir de la Tabla 1 que ninguna mutación única produjo una muteína de IL-2 inactiva en ambos ensayos. Sin embargo, se puede derivar que una combinación de mutaciones que produce una actividad gravemente comprometida a partir de dos posiciones diferentes podría potencialmente dar como resultado un antagonista de la actividad de IL-2 en las células T, u otros tipos celulares que portan receptores IL-2 de alta afinidad que porta los tipos de células. Se predijo dicho antagonista a partir de estos datos, ya que se han diseñado las mutaciones para alterar únicamente las interacciones con IL-2R β e ILR2 γ . Uno de dichos ejemplos podría ser la muteína doble D20R/Q126T. Se predijo que la combinación de mutaciones débilmente activas en una molécula, es combinatoria en la naturaleza, esto es, D20R tiene una actividad de 0,00018 en las células T, Q126T tiene una actividad de 0,0001 en las células T, y podría esperarse que la muteína doble D20R/Q126T tenga la actividad de 0,000000018 de la IL-2 de tipo salvaje en las células T. Se pueden derivar otras combinaciones a partir de los datos proporcionados.

Ejemplo 6

Actividad biológica de las muteínas de IL-2 e IL-2 de tipo salvaje

Las Figuras 1 a 7 muestran la curvas de dosis-respuesta de la IL-2 de tipo salvaje humana (IL-2) y D20H (Fig. 1), IL-2 y D20I (Fig. 2), IL-2 y N88G (Fig. 3), IL-2 y N88I (Fig. 4), IL-2 y N88R (Fig. 5), IL-2 y Q126E (Fig. 6), e IL-2 y Q126L (Fig. 7). A: dosis respuesta individual de IL-2 (círculos negros) y muteína (círculos blancos) en el ensayo de proliferación de células T humanas primarias (blastos PHA). B: Dosis respuesta individual de IL-2 (triángulos cerrados) y muteína (triángulos blancos) en el ensayo de proliferación de células NK humanas primarias.

De manera particular con respecto a la Fig. 1, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ M para el ensayo de las células T (A) y aproximadamente 1×10^{-10} M para las células NK (B). La DE_{50} para D20H fue aproximadamente 2×10^{-10} M en este ensayo de células T, pero se estimó que era $> 1 \times 10^{-5}$ M en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de D20H sobre la actividad de las células NK es de esta manera $>$ de 50.000 veces tal como se determinó para este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

De manera particular con respecto a la Fig. 2, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ M para las células T (A) y aproximadamente 3×10^{-10} para el ensayo de células NK (B). La DE_{50} para D20I fue también aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ M en este ensayo de células T, pero se estimó en sólo aproximadamente 5×10^{-6} M en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de D20I sobre la actividad de las células NK es de esta manera aproximadamente 16,000 veces tal como se determinó para este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

ES 2 281 175 T3

De manera particular con respecto a la Fig. 3, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente 4×10^{-11} M para las células T (A) y aproximadamente 2×10^{-10} M para el ensayo de las células NK (B). La DE_{50} para N88G fue aproximadamente 5×10^{-12} M en este ensayo de células T, pero se estimó en sólo aproximadamente 3×10^{-8} M en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de N88G sobre la actividad de las células NK es de esta manera aproximadamente 1.200 veces tal como se determinó por este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

De manera particular con respecto a la Fig. 4, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ M para las células T (A) y aproximadamente 1×10^{-10} M para el ensayo de células NK (B). La DE_{50} para N88I fue aproximadamente 10^{-10} M en este ensayo de células T, pero se estimó en sólo aproximadamente 5×10^{-6} en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de N88I sobre la actividad de las células NK es de esta manera aproximadamente 18.00 veces tal como se determinó por este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

De manera particular con respecto a la Fig. 5, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente $1,5 \times 10^{-10}$ M para las células T (A) y aproximadamente 1×10^{-10} para el ensayo de células NK (B). La DE_{50} para N88R fue aproximadamente 9×10^{-11} M en este ensayo de células T, pero se estimó en sólo aproximadamente 3×10^{-7} M en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de N88R sobre la actividad de las células NK es de esta manera aproximadamente 500 veces tal como se determinó para este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

De manera particular con respecto a la Fig. 6, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente 8×10^{-12} M para las células T (A) y aproximadamente 5×10^{-11} M para el ensayo de células NK (B). La DE_{50} para Q126E fue aproximadamente 8×10^{-13} M en este ensayo de células T, pero se estimó en sólo aproximadamente 2×10^{-9} en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de Q126E sobre la actividad de las células NK es de esta manera aproximadamente 400 veces tal como se determinó para este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

De manera particular con respecto a la Fig. 7, para el experimento que se muestra, la dosis de IL-2 de tipo salvaje proporciona un 50% de proliferación máxima (DE_{50}) es aproximadamente 5×10^{-11} M para las células T (A) y aproximadamente 8×10^{-11} para el ensayo de células NK (B). La DE_{50} para Q126L fue aproximadamente 2×10^{-11} M en este ensayo de células T, pero se estimó en sólo aproximadamente 2×10^{-8} M en este ensayo de células NK. La mejora neta en la actividad de las células T de Q126L sobre la actividad de las células K es de esta manera aproximadamente 625 veces tal como se determinó para este ensayo. Se obtuvieron resultados similares con sangre de donantes adicionales (no se muestran los datos).

Ejemplo 7

Estudios de toxicidad en chimpancé

Se seleccionó IL-2/N88R a partir de las proteínas mutantes de IL-2 de la Tabla I debido a su actividad agonista selectiva de las células T demostrada en ensayos de células T y NK humanas primarias. En relación con la IL-2 de tipo salvaje, es aproximadamente 6000 veces mas activa en las células T que en las células NK, y presenta actividad esencialmente equivalente a la de la IL-2 de tipo salvaje en las células T. Se produjo IL-2/N88R en células CHO, se purificó, y se evaluó en un modelo de chimpancé de actividad y toxicidad de IL-2. En este modelo *in vivo*, se presentó una actividad en las células T comparable a la de un variante recombinante de IL-2 comercialmente disponible (PROLEUKINTM), Chiron Corporation, Emeryville, CA), aunque, en comparación, indujo sólo unos efectos secundarios suaves (ambas en términos de parámetros objetivos y clínicos)

A. Diseño experimental

1. Materiales y Procedimientos

La porción *in vivo* del estudio tuvo lugar en el New Iberia Research Center (New Iberia, LA, Sponsor Bayer Corporation, Berkeley, CA) e implicó dos fases de estudios y 11 chimpancés machos de jóvenes adultos a adultos con pesos corporales que oscilaban entre aproximadamente 45 y 70 kg.

La fase I del estudio fue una fase de determinación de la dosis e implicó liberar una dosis subcutánea de un vehículo o una dosis subcutánea de PROLEUKIN a $1,2 \text{ mg/m}^2$, dos veces diarias (BID) durante 5 días. La Fase II del estudio es una comparación del vehículo, PROLEUKIN, e IL-2/N88R proporcionados por vía subcutánea, cada 12 horas (q12h) durante 5 días. Se seleccionó la dosis de IL-2/N88R para proporcionar una exposición comparable a PROLEUKIN basándose en el análisis farmacocinético. Se tomaron muestras de sangre para los análisis de la química de la sangre, CBC, hematología/coagulación, y análisis FACS de las poblaciones de células T y NK tal como se detalla en las Secciones 5 y 6.

ES 2 281 175 T3

TABLA 2A

Protocolo de la Fase I

	Número de Grupo	Número de Animales	Artículo de Ensayo	Dosis	Frecuencia
5	1	1	Vehículo	NA	BID durante 5 días
10	2	2	PROLEUKIN	1,2 mg/m ²	BID durante 5 días

TABLA 2B

Protocolo de la Fase II

	Número de Grupo	Número de Animales	Artículo de Ensayo	Dosis	Frecuencia
20	1	2	Vehículo	2,4 ml/m ²	q 12 h durante 5 días
	2	3	PROLEUKIN	1,2 mg/m ²	q 12 h durante 5 días
25	3	3	IL-2/N88R	1,2 mg/m ²	q 12 h durante 5 días

2. Procedimiento de dosificación

En los días de estudio en los que se obtuvo la sangre, los animales se anestesiaron completamente usando ketamina IM a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg antes de la administración del artículo de ensayo o vehículo. En los días de estudio en los que no se requirió muestreo de sangre, se contuvo físicamente a los animales usando una jaula de contención antes de la administración del artículo de ensayo o vehículo. Se administró la dosis mediante inyección subcutánea cada 12 horas durante 5 días, y se cortó el pelo del lugar de la inyección en el Día 1 del estudio. Se registró para cada dosis el lugar y el momento de la dosificación.

3. Observaciones clínicas

(a) *Observaciones diarias y consumo de alimentos.* Se observó cada animal dos veces diarias y se informó de cualquier observación anormal al Director del Estudio. Se informó al Director del Estudio, el Veterinario del Proyecto y el Representante del Patrocinador de los animales que parecían enfermos. Se confirmó el consumo de alimento y se registró dos veces diarias mediante observación visual.

(b) *Pesos corporales.* Se tomaron los pesos corporales antes del estudio, antes de dosificar en el día 1, y cada vez que se sedaron los animales para la recogida de sangre.

(c) *Observación de los lugares de la inyección.* Se observaron diariamente los lugares de la inyección. Se registró cualquier apariencia anormal tal como enrojecimiento o hinchazón.

ES 2 281 175 T3

TABLE 3A

Calendario para la recogida de muestras de la Fase II

	Tiempo	CBC	CHEM	COAG	FACS	ENSAYO DEL PATROCINADOR
5	Preestudio	X	X	X	X	X
10	Día 1, predosis	X	X	X	X	X
15	Día 1, 15 min					
20	Día 3, predosis	X	X	X	X	X
25	Día 3, 15 min					X
30	Día 6	X	X	X	X	X
	Día 8	X	X	X	X	X
	Día 10	X	X	X	X	X
	Día 12	X	X	X	X	X
	Día 15	X	X	X	X	X
	Día 30	X	X	X	X	X

4. Manipulación de la muestra

(a) *Químicas del suero.* Se recogieron muestras de aproximadamente 2 ml de sangre de cada animal en tubos sin anticoagulante en los momentos puntuales especificados anteriormente. Se documentaron los tiempos de recogida de muestras y se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron las muestras, se separó el suero y se envió al NIRC Clinical Pathology Laboratory. Se incluye en la Tabla 4 el panel de química del suero estándar del NIRC:

TABLE 4

Panel de química de la sangre

50	Sodio	Fósforo
	Potasio	Nitrógeno de urea
55	Cloruro	Creatinina
	Bilirrubina total	Proteína total
	Fosfatasa alcalina	Albúmina
60	Lactato deshidrogenada (LDH)	Relación albúmina / Globulina
	Aspartato aminotransferasa (AST)	Glucosa
	Alanina aminotransferasa (ALT)	Calcio
65	Dióxido de carbono (CO ₂)	Gamma-glutamil transferasa (GGT)

(b) *Hematología*. Se recogieron muestras de aproximadamente 2 ml de sangre de cada animal en tubos con EDTA en los momentos puntuales anteriormente especificados y se mandaron al NIRC Clinical Pathology laboratory. Se llevó a cabo el panel de hematología estándar del NIRC, incluyendo el recuento completo de la sangre, el diferencial, y el recuento de plaquetas, sobre todas las muestras.

(d) *Ensayos del patrocinator*. Se recogieron muestras de aproximadamente 6 ml de sangre con EDTA como anticoagulante en los momentos especificados anteriormente. Se documentaron los momentos de la recogida de sangre. Se centrifugaron las muestras, se separó y se introdujeron partes alícuotas del plasma en tres tubos separados. Se almacenó congelado el plasma (-60°C o por debajo) y se envió por correo a la Bayer Corporation, Berkeley, CA, tan pronto como el estudio estuvo completo.

5. FACS

(a) *Procedimiento*. Se recogió una muestra de aproximadamente 5 ml de sangre en anticoagulante de heparina de sodio en los momentos especificados por el análisis FACS.

Se obtuvo un espécimen de sangre completa en EDTA, ACD o heparina. Se ajustaron los números de células para estar en el intervalo de 2 a 20000 por mm³.

Se marcaron de manera apropiada tubos de plástico o vidrio de 12 x 75 para el panel de anticuerpos que se está llevando a cabo. Se añadieron el anticuerpo o el cóctel de anticuerpos a los tubos siguiendo los volúmenes sugeridos por el fabricante.

Se añadieron 100 µl por tubo de espécimen de sangre mezclada y se incubó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente, protegida de la luz.

Tras la incubación, se añadieron 2 ml de solución de lisado (solución de lisado FACS de marca Becton Dickinson, BDn° 92-0002), se agitó en vórtice suavemente la mezcla y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos a 300 x g. Se decantaron los sobrenadantes, se hizo desaparecer el exceso de líquido y se añadió 1 ml de tampón PBS (GIBCO 14190-144) a cada sedimento celular. Después de agitar en vórtice suave, se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 min a 300 X g. Se decantaron los sobrenadantes y se hizo desaparecer el exceso de líquido antes de añadir 1 ml de solución fijadora (solución de formaldehído al 0,5%, preparada diluyendo 1:20 de formaldehído al 10% (Polyscience, Inc. N° 0418) con tampón PBS) sobre el sedimento celular y agitando en vórtice suavemente para la resuspensión. A continuación se analizaron las muestras en un Coulter EPICS SL Flor Cytometer.

Anticuerpos usados para el estudio: MlgG1/MlgG1 isotipo control (Becton Dickinson, Cat. N° 349526), CD45-PerCP (Becton Dickinson, Cat. N° 347464), CD8-FITC (Becton Dickinson, Cat. N° 347313), CD25-PE (Becton Dickinson, Cat. N° 30795X), CD4-FITC (Becton Dickinson, Cat. N° 340133), CD16-PE (Pharmingen, Cat. N° 347617), CD3-PerCP (Becton Dickinson, Cat. N° 347344).

6. Perfil de coagulación

Se recogió una muestra de sangre completa de aproximadamente 2 ml en tubos en los que se añadió citrato de sodio como anticoagulante en los momentos puntuales especificados anteriormente. El perfil de coagulación estuvo constituido por el Tiempo de Protrombina (PT), el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) y el Fibrinógeno.

B. Resultados y discusión

1. Determinación de la dosis de PROLEUKIN

El objeto primario de esta fase fue identificar una dosis óptima de PROLEUKIN por comparación con IL-2/N88R. Se pretendió que esta dosis óptima de PROLEUKIN fuera una dosis tolerable (inferior que la dosis máxima tolerada) que tuviera idealmente una significación clínica, pero con una toxicidad moderada y reversible. Se determinó la BID, una dosis de PROLEUKIN de 1,2 mg/m², como la dosis inicial basada en la extrapolación de especies cruzadas basada en regímenes de dosis clínicas de PROLEUKIN, sus toxicidades correspondientes, y los resultados de dosis-respuesta de PROLEUKIN en mono cynomolgus estabulado.

Se trataron dos chimpancés de esta manera con PROLEUKIN. Estos animales cada vez fueron menos activos, estaban cada vez más agotados y deshidratados durante el curso de la dosificación. Ambos animales desarrollaron síntomas gastrointestinales graves que comenzaron en los días 3 ó 4, incluyendo apetito reducido, diarrea y vómitos. Se interrumpió la dosificación de un animal (número X-159) después de 3 días de dosificación debido a disfunción renal grave (Figura 8A&B) y hepática moderada (Figura 8C&D) reflejada en las químicas de la química de la sangre. Éstas incluyen elevaciones del nitrógeno de la urea en sangre (BUN), creatinina, y bilirrubina total, ALT (SGPT). Se administró solución de Ringer lactada por vía intravenosa a ambos animales tratados con PROLEUKIN en los días 3 y 4 (animal X-159) y únicamente en el día 4 (animal X-124) como resucitación o para evitar la deshidratación adicional. Se retiró el animal número X-159 del estudio en el día 8 debido a la disfunción renal y a un posible trombo

en la pierna derecha tal como se indicó por un pulso muy mínimo (femoral), y la pantorrilla completa estuvo fría e hinchada. Aunque se observó toxicidad significativa en un animal, el otro animal experimentó acontecimientos menos graves y el perfil de acontecimientos adversos para ambos animales fue reversible. Basándose en esto, se determinó que una q12h de 1,2 mg/m² de PROLEUKIN y la dosis equivalente (en función de la exposición) de IL-2/N88R era un régimen de dosis apropiado para comparar estos dos compuestos.

2. Comparación de IL-2/N88R con PROLEUKIN

Observaciones clínicas. La Tabla 5 relaciona las observaciones clínicas hechas durante el estudio. Se informan los valores en una escala de 0 a 5, en la que 5 es grave. Todos los animales tratados con PROLEUKIN estuvieron gravemente enfermos; hubo un tratamiento con PROLEUKIN asociado con muerte. Los valores informados después del día 6 para el grupo del PROLEUKIN reflejan los datos de los dos animales restantes. El efecto secundario más obvio del tratamiento con IL-2/N88R parece ser la perturbación GI suave (emesis) aunque el tratamiento indujo toxicidad nominal en los términos de los parámetros indicados en la Tabla 4. El peso corporal del grupo de PROLEUKIN disminuyó en un 6% en el día 6 y cayó tan bajo como un 10% en el día 10 y se recuperó lentamente posteriormente (véase la Figura 9). Por contraste, IL-2/N88R y los grupos vehículo tienen meramente un 1-3% de pérdida de peso como máximo.

TABLA 5

*Observaciones clínicas**

Tratamiento	Condición general	Pérdida de apetito	Letargia	GI	Malestar
IL-2N88R	Buena	1	1	2	1
PROLEUKIN	Gravemente enfermo	5	4/5	5	4/5
Vehículo	Normal	0	0	0	0,

* Escala de 0 a 5, en la que 5 es lo más grave

(a) *Hematología.* IL2-N88R indujo efectos celulares coherentes con la activación de PROLEUKIN, de manera concreta linfocitosis (Figura 10A), y se observaron también aumento en las glóbulos blancos de la sangre (Figura 10B) y neutrófilos (Figura 10C). IL2-N88R indujo únicamente una trombocitopenia marginal (nadir de aproximadamente 50%) durante la porción de tratamiento del estudio (Figura 10D)

(b) *Función renal.* Los niveles de BUN fueron marcadamente más altos en los animales tratados con Proleukin en los días 6 y 8 (Figura 11A). Los niveles de BUN fueron más de 130 mg/dL en dos de estos animales; los niveles de creatinina aumentaron también espectacularmente en los dos animales en los días 6 y 8 (Figura 11B) indicando una desaparición completa de la función renal. De manera adicional, el fósforo del suero y el vacío de aniones también aumentaron en el grupo tratado con PROLEUKIN en los días 6 y 8. Por contraste, en todos los animales con IL2-N88R, estos parámetros renales permanecieron básicamente normales a lo largo del estudio (Figura 11C&D).

(c) *Función hepática.* La bilirrubina total llegó a más del triple en el grupo del PROLEUKIN en el día 6 y permaneció alta hasta el día 10 (Figura 12A). En contraste, únicamente un animal en el grupo de IL2-N88R tuvo un incremento menor transitorio en los días 3 y 6. El nivel de SGPT del suero se elevó espectacularmente y alcanzó sobre 100 U/L en todos los animales con PROLEUKIN en el día 6 (Figura 12B). El nivel de SGPT en el animal número A199 alcanzó 651 U/L, y el SGOT 2789 U/L (Lab Note Book: NIRC n° 8754-9852 - Fase II, Valores Químicos Medios Individuales y de Grupo, página 17 de 21 de la tabla) indicando una insuficiencia hepática grave.

(d) *Coagulación.* El nivel de Fibrinógeno alcanzó más del doble en los grupos de PROLEUKIN e IL2-N88R y alcanzó el pico en el día 6 (Figura 12C). El incremento parece suceder más pronto en el grupo de PROLEUKIN que en los animales de IL2-N88R. Esto se reflejó por un incremento del 51% frente al 5% en el día 3. Los cambios en el fibrinógeno pueden ser un resultado de la respuesta aguda de la proteína, en lugar de un defecto en la coagulación, ya que no hubo cambios significativos en APTT o PT de acuerdo con esto durante el mismo período de tiempo (Figura 12D). Sin embargo, al inicio del día 10, el nivel de APTT en los animales con PROLEUKIN mostró una tendencia al alza obvia aunque el valor absoluto permaneció dentro del intervalo normal. La misma tendencia, aunque en una extensión inferior, se observó también en el grupo con IL2-N88R. De manera interesante, sin embargo, el nivel de fibrinógeno pareció caer durante el mismo período de tiempo de acuerdo con esto en ambos grupos.

(e) *Homeostasis.* Los niveles de sodio en suero disminuyeron hasta por debajo de 135 MEQ/L en dos de los tres animales con PROLEUKIN en el día 8, pero permanecieron normales en el resto de animales (Figura 13A). Los niveles

de cloruro en el grupo de PROLEUKIN se redujeron también hasta por debajo de 95 MEQ/L comenzando en el día 3 y permaneciendo bajos hasta el día 15 (Figura 13B). El nivel de calcio fue inferior en dos de los tres animales con PROLEUKIN en los días 6 y 8, y alcanzó un nivel tan bajo como 4,9 y 3,2 mg/dL en el animal A199 (Figura 13C). El nivel de potasio disminuyó hasta por debajo de 2MEQ/L entre los días 3 y 12 en todos los animales tratados con PROLEUKIN excepto en el animal A199 cuyo nivel de potasio aumentó de hecho hasta un nivel tóxico de 7,2 MEQ/L antes de ser retirado del estudio (Figura 13D).

(f) *Signos de pérdida vascular.* El nivel de albúmina en suero disminuyó en los grupos tratados con PROLEUKIN (37%) e IL2-N88R (19%) (Figura 14A). Se observó un aumento en el nivel del hematocrito en el grupo tratado con PROLEUKIN en los días 3 y 6 (Figura 14B). Por contraste, los niveles del hematocrito en los grupos de vehículo control e IL2-N88R disminuyeron durante el mismo período de tiempo y permanecieron bajos indicando anemia suave tal como se esperaba debido a múltiples recogidas de muestras de sangre (Figura 14B&C). La elevación del hematocrito en el grupo tratado con PROLEUKIN, cuando se acopla con una disminución en la albúmina, que es coherente con el desarrollo del síndrome de pérdida de capilares.

3. Activación celular

Se siguió la eficacia PROLEUKIN e IL2-N88R mediante la variación del porcentaje de linfocitos CD25 positivos (tráfico + proliferación) y la media de la fluorescencia para CD25 o el número de antígenos de CD25 expresados en la superficie de una célula T dada (CD25 = IL-2R de baja afinidad). Se siguió la expresión de CD25 en la población total de células T (células CD3+) así como en las poblaciones CD3+CD4+ y en las CD3+CD8+.

Se siguió la actividad de IL-2 en las células Asesinas Naturales (NK) mediante un análisis del tráfico de células CD3-CD16+ y CD3-CD25+CD16+ NK. Se determinaron los números absolutos de células CD3+, CD4+, CD8+ y NK multiplicando el porcentaje de células por el número de linfocitos por mm³, y se obtuvieron los datos durante el análisis de hematología.

(a) Regulación de la expresión de CD25 sobre la superficie de las células T

Se sobrerreguló el porcentaje de células T activadas, tal como se indica por las células CD25 positivas el día 6 del estudio, la mayor parte en la subpoblación de células CD3+CD4+ T. PROLEUKIN parece inducir la expresión de CD25 en un porcentaje más alto de las subpoblaciones totales de CD3+, CD3+CD4+, y CD3+CD8+ de células T en el día 6. Sin embargo, en el día 8 el porcentaje de células que expresan el antígeno CD25 fue idéntico en los linfocitos de los chimpancés tratados con PROLEUKIN o los chimpancés tratados con IL2-N88R (Figura 15A, B y C). No se observó tinción para CD25 en la superficie de la población de células Asesinas Naturales (NK) en los chimpancés tratados con PROLEUKIN o IL2-N88R. La ausencia de expresión de IL-2R α (el antígeno diana para la tinción de la superficie de la célula por CD25) en la superficie de la población de células NK seleccionadas (CD3-/CD16+) es sospechosa de ser responsable de estos resultados.

El número absoluto de células CD3+CD25+ T siguió un modelo similar al del porcentaje de células CD3+CD25+ T, apareciendo PROLEUKIN más activa que IL2-N88R (Fig. 16A). IL2-N88R presentó un potencial de activación de las células T similar al de PROLEUKIN sobre la población de células CD3+CD4+ T, ya que la sobrerregulación del número absoluto de linfocitos CD3+CD4+CD25+ inducida por IL2-N88R fue idéntica a la sobrerregulación observada con PROLEUKIN (Fig. 16B). PROLEUKIN pareció aumentar el número de células CD3+CD8+CD25+ T en una extensión mayor que IL2-N88R (Fig. 16C).

El número de moléculas de CD25 (media de la fluorescencia) expresadas en la subpoblación de células CD3+CD4+ T siguió cinéticas idénticas con el tratamiento con PROLEUKIN o IL2-N88R (Fig. 17).

(b) Tráfico de linfocitos; efecto del tratamiento con PROLEUKIN e IL2-N88R

Se determinaron las actividades de PROLEUKIN e IL2-N88R en las poblaciones de células T y NK mediante el análisis de la variación en el número absoluto de linfocitos en circulación, antes, durante y después del tratamiento (Fig. 18). IL2-N88R pareció tener una actividad mayor que PROLEUKIN en el incremento del número absoluto de linfocitos CD3+CD4+ en circulación (Fig. 18A), y una actividad ligeramente reducida en comparación con PROLEUKIN en el incremento del número absoluto de linfocitos CD3+CD8+ en circulación (Fig. 18B). Ambos compuestos tienen un efecto comparable, aunque modesto, sobre el aumento del número total de linfocitos CD3+ (Fig. 18C). Ni PROLEUKIN ni IL2-N88R afectaron el tráfico de las células NK (Fig. 18D).

C. Conclusión

IL2-N88R fue generado mediante una selección de las proteínas IL-2 mutantes en ensayos de células T y NK primarias en seres humanos. Este presentó una selectividad *in vitro* para las células T sobre las células NK de aproximadamente 6000 veces. Basándose en este perfil celular, se postuló que podría inducir únicamente efectos secundarios suaves cuando se administra a dosis que podrían estimular la activación significativa de las células T. Los experimentos en chimpancé, comparando PROLEUKIN con IL2-N88R, confirmaron que IL2-N88R tuvo un significativo mejor perfil de seguridad que PROLEUKIN, reteniendo a la vez una capacidad comparable para inducir la activación de las células T.

ES 2 281 175 T3

Ejemplo 8

Eficacia del agonista selectivo N88R de IL-2 en el modelo del tumor con metástasis del pulmón CT26 murino

5 *Protocolo.* Se inyectaron ratones (Balb/c hembras, 6-8 semanas de edad) por vía intravenosa (IV) con 1×10^5 de células CT-26 (carcinoma de colon murino) en 0,2 ml de PBS en la vena lateral de la cola en el día 0. El tratamiento fue con PROLEUKIN o IL2-N88R a dosis diferentes (diluyente: dextrosa al 5% en agua /D5W)), o D5W, dosificado IV, una vez diaria durante 8 días (QD x 8) comenzando el día 1 después del implante. Se preparó IL2-N88R a temperatura ambiente mediante dilución en D5W usando viales siliconizados usando una jeringa de tuberculina y dosificando a los animales antes de las 2 horas desde la preparación. Se preparó PROLEUKIN añadiendo 0,7 ml de agua estéril para inyección (SWFI) a cada vial (concentración final, 1,86 mg/ml). Se llevaron a cabo las diluciones tal como se ha descrito para IL2-N88R en D5W (Tabla 6). Se sacrificaron los animales en el Día 11. Se retiraron los pulmones y se pesaron, se enjuagaron en PBS, y se transfirió el tejido a solución de Bouin. 24 horas más tarde, se transfirió el tejido a formalina al 10%. Se contó el número de colonias metastásicas en los pulmones bajo un microscopio de disección.

TABLA 6

Dosis y grupos en el estudio del modelo del tumor CT-26 murino

Grupos	N	Tratamiento	Dosis, mg/kg
1	14	D5W	NA
2	11	PROLEUKIN	3 mg/kg
3	11	PROLEUKIN	10 mg/kg
4	11	IL2-N88R	1 mg/kg
5	12	IL2-N88R	3 mg/kg
6	12	IL2-N88R	10 mg/kg
7	12	IL2-N88R	30 mg/kg
8	11	IL2-N88R	60 mg/kg

La Tabla 7 muestra el número de metástasis contadas en ratones individuales. Se observó una eficacia comparable para IL2-N88R y PROLEUKIN. A dosis altas de IL2-N88R (grupo 8, 60 mg/kg), todos los ratones menos uno tuvieron 12 metástasis o menos; 3 de los ratones no presentaron metástasis. Esto contrasta con la dosis más alta de PROLEUKIN ensayada, en la que todos los ratones supervivientes tuvieron 12 metástasis o más.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 7. Se relacionan los recuentos de metástasis individuales y medios

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

Se observó reducción significativa ($P < 0,05$) en la metástasis en ratones tratados con IL2-N88R a dosis de 10, 30, y 60 mg/kg (grupos 6, 7, y 8, de manera respectiva), y en un grupo tratado con 10 mg/kg de PROLEUKIN (grupo 3). Se muestran gráficamente estos resultados en la Fig. 19. Se representan gráficamente los datos usando el logaritmo de la dosis: para PROLEUKIN las dosis fueron a 3 y 10 mg/kg, para IL2-N88R, las dosis fueron a 1, 3, 10, 30, y 60 mg/kg. El ajuste de la curva usando una ecuación no lineal (ajuste de 4 parámetros) dio como resultado valores CI_{50} de 5,2 mg/kg para PROLEUKIN, y 10,9 mg/kg para IL2-N88R.

A partir de los datos de este experimento, se calculó que la CI_{50} con respecto a la reducción en el número de metástasis para IL2-N88R era 10,9 mg/kg (8,6-13,9 mg/kg al 95% de confianza), y para PROLEUKIN era 5,2 mg/kg (3,5-7,7 mg/kg al 95% de confianza).

Se muestra en la Tabla 8 la supervivencia de los ratones. En el grupo de 10 mg/kg de PROLEUKIN, murió un (1) ratón en el Día 7, y murieron 5 (5) más en el Día 8. Murió un (1) ratón en el día 8 en cada uno de los grupos tratados con 3 ó 10 mg/kg de IL2-N88R, y no se observó muerte en 1, 30, ó 60 mg/kg de IL2-N88R. De manera adicional, la mayor parte de los ratones tratados con 3 mg/kg de PROLEUKIN y todos los ratones tratados con 10 mg/kg de PROLEUKIN estuvieron moribundos; no se observó morbilidad en los ratones tratados con IL2-N88R.

TABLA 8

Supervivencia de ratones tratados con IL2-N88R o PROLEUKIN

Grupo	Día			
	0	7 ⁴	8	11
D5W ¹	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Pro: 3mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Pr0: 10 mg/kg ²	100,0 %	90,9 %	45,5 %	45,5 %
IL2-N88R: 1 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
IL2-N88R: 3mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	91,7 %	91,7 %
IL2-N88R: 10 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	91,7 %	91,7 %
IL2-N88R: 30 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
IL2-N88R: 60 mg/kg ²	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

¹n = 14 ratones / grupo

²n = 11 ratones / grupo

³n = 12 ratones / grupo

⁴No se observaron muertes antes del día 7

Los animales tratados con PROLEUKIN en ambos grupos estuvieron moribundos. No se observó morbilidad en ninguno de los animales tratados con IL2-N88R.

En resumen, estos estudios indican que IL2-N88R es tan eficaz como PROLEUKIN para reducir la carga tumoral (tal como se midió por el recuento de metástasis del pulmón en el modelo CT26). De manera adicional, se demuestra que IL2-N88R es sustancialmente menos tóxica que PROLEUKIN.

Ejemplo 9

Desarrollo de líneas de células CHO de alta producción, estables, que expresan IL2-N88R

Se desarrolló la producción estable de líneas de células que segregan altas cantidades de muteína IL2-N88R transfecando células CHO(dhfr-) con el vector de expresión que se muestra en la Figura 20. Se muestran los elementos individuales del vector de expresión IL2-N88R en el mapa del plásmido (Fig. 20). Éste muestra CMVe/p = promotor temprano del citomegalovirus; PA = secuencia señal de poliadenilación de SV40; y DHFR = módulo de expresión de la dihidrofolato reductasa.

Se construyó el vector usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Véase generalmente Sambrook y col., *Molecular Cloning*, 2ª ed., 1989, Cold Spring Harbor Press; *Short Protocols in Molecular Biology*, 2ª ed., 1992, John Wiley & Sons; *Methods in Enzymology* vol. 185, Rd. Goeddel y col., Academic Press, Inc., Londres, 1991. El vector de expresión contiene los módulos de expresión discreta para el gen IL2N88R y el gen amplificable y seleccionable DHFR (dihidrofolato reductasa). Se transfectaron aproximadamente 1×10^6 células CHO (ovario de hámster chino) con $10 \mu\text{g}$ de pBC1IL2SA usando reactivos de Lipofectina (Life Technology Inc., Bethesda, Maryland) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación se seleccionaron las células en presencia de metotrexato 50 nM y se cultivaron en medio DME/F12 (Life Technology Inc.) deficiente en timidina e hipoxantina más suero bovino fetal dializado al 5%. Se seleccionaron las poblaciones de células para la producción de IL2N88R con un kit ELISA comercial (R & D Systems). Se volvieron a seleccionar las poblaciones de alta producción en medio que contenía concentraciones aumentadas de metotrexato (metotrexato 100 a 400 nM) y se seleccionaron para la producción de IL2N88R. A continuación se aplicó la clonación mediante dilución limitante para derivar los clones con productividad elevada y estable. Se llevó a cabo la clonación en ausencia de metotrexato usando técnicas convencionales de cultivo de tejidos.

Ejemplo 10

Producción libre de suero de IL2N88R en un biorreactor de perfusión

Se llevó a cabo la producción continua de IL2N88R mediante fermentación con perfusión continua. Se inoculó un fermentador Wheaton de 19 litros con la línea de células CHO estable del Ejemplo 9 a 2×10^6 células/ml y se perfusionó a una velocidad de intercambio de medio de 5 litros/día. El medio de producción fue medio basado en DME/F12 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) suplementado con insulina humana recombinante ($10 \mu\text{g/ml}$) (HUMULINTM Eli Lilly, Inc., Indianápolis, IN) y $\text{FeSO}_4\cdot\text{EDTA}$ ($50 \mu\text{M}$). Se mantuvo la densidad celular a 4×10^6 células/ml. El resultado diario promedio del fermentador fue aproximadamente 200 mg/día . La producción de IL2N88R fue mantenida de manera estable durante 30 días.

Ejemplo 11

Purificación de IL2-N88R producida en células CHO

Se aplicó el siguiente procedimiento al eluato de la perfusión descrito anteriormente. Se cosechó el medio de perfusión y se aplicó a una columna de S-sefarosa. Se equilibró la columna con Tampón Fosfato 20 milimolar con NaCl 5 milimolar a $\text{pH } 7,0$. Se ajustó el alimento ("TCF") a una conductividad de 4 milisiemens con la adición de agua y se ajustó al mismo pH con ácido fosfórico.

Después de que se cargó el TCF se lavó la columna en el mismo tampón de equilibrio. Se llevó a cabo la elución mediante un cambio de pH . Se eluyeron las muteínas con etanolamina 20 mM , $\text{pH } 10,5$, para lavar las muteínas fuera de la columna para producir el S-eluato.

Se llevó a cabo el intercambio aniónico pasando el S eluato a través de una columna de QAE Fast FlowTM (Pharmacia) equilibrada con tampón Bicarbonato 10 mM a $\text{pH } 10,5$. Se mantuvo el caudal a 250 cm/h . Después del lavado hasta la línea base, se eluyó la IL-2SA con fosfato 20 mM , $\text{pH } 4,0$.

Se llevó a cabo la cromatografía de hidroxiapatito (HAP) pasando el eluato QAE diluido (1:1 con WFI) a lo largo de una columna cargada con hidroxiapatito cerámico (Tipo II, BioRad, Hercules, CA) equilibrada con Fosfato $0,10 \text{ mM}$ a $\text{pH } 7,0$. Se mantuvo el caudal a 250 cm h^{-1} . Después del lavado hasta la línea de base, se eluyó la IL2SA con Fosfato 100 mM a $\text{pH } 7,0$.

Se ultrafiltró el eluato de hidroxiapatito hasta 300 ml volúmenes con una unidad Millipore Pelicon-2 equipada con tres cartuchos PES 5K (Millipore Corporation, Bedford, MA).

El eluato HAP ultrafiltrado se purificó de manera adicional mediante el paso a lo largo de una columna de exclusión molecular S100HR (Pharmacia) a 35 cm/h . Se equilibró la columna con Fosfato 10 mM y NaCl 150 mM , $\text{pH } 7,0$.

Se diluyó la agrupación de la Filtración del Gel para conseguir una conductividad de $4,0 \text{ mMhos/cm}$ y se volvió a aplicar a la S-Sefarosa bajo las condiciones anteriormente descritas. Se eluyó IL2SA con tampón Fosfato 10 mM con NaCl 1 Molar a $\text{pH } 7,0$.

Se dializó la agrupación del intercambio catiónico final frente a la Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) durante la noche y se diluyó con PBS estéril hasta una concentración de 6 mg/ml . La agrupación diluida final se esterilizó mediante filtración, se dividió en partes alícuotas, y a continuación se congeló a -70°C . La recuperación total fue del 65%.

Otras formas de realización de la invención llegarán a ser aparentes para una persona experta en la técnica. Esta invención enseña cómo obtener muteínas no específicamente descritas en el presente documento, pero que producen la activación de las células T tal como se evidencia por la proliferación de blastos PHA, y una proliferación reducida de células NK, y por tanto, aquellas muteínas entran dentro del espíritu y alcance de la invención. El concepto y

ES 2 281 175 T3

la solución experimental descritos en el presente documento, deberán ser aplicables a otras citoquinas que utilizan sistemas de receptores multiméricos heterólogos, de manera particular las citoquinas relacionadas IL-7, IL-9 e IL-15, interferón α , e interferón γ .

5 Secuencias

Esta solicitud contiene las siguientes secuencias:

SEC DE ID N°: 1: hIL-2 (aminoácido)

SEC DE ID N°: 2: hIL-2 (ADNc)

SEC DE ID N°: 3: Cebador 5' PCR, IL-2

SEC DE ID N°: 4: Cebador 3' PCR, IL-2

SEC DE ID N°: 5: Cebador de la mutagénesis para el vector de expresión IL-2

SEC DE ID N°: 6: Cebador de la mutagénesis para las mutaciones D20X

SEC DE ID N°: 7: Cebador de la mutagénesis para las mutaciones N88X

SEC DE ID N°: 8: Cebador de la mutagénesis para las mutaciones Q126X

REIVINDICACIONES

1. Una muteína de IL-2 humana numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje que tiene una sustitución de un aminoácido en una de las posiciones 20, 88, y 126, en la que

la posición 20 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: alanina, histidina, isoleucina, metionina, glutamina, serina, valina, o tirosina

la posición 88 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: alanina, arginina, ácido glutámico, histidina, lisina, leucina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, serina, treonina, tirosina o valina;

la posición 126 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: asparagina, leucina, prolina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, arginina, serina, treonina, tirosina o valina;

y por lo cual dicha muteína de IL-2 activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

2. La muteína de IL-2 de la Reivindicación 1, en la que la posición 88 está sustituida por arginina.

3. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico y la muteína de IL-2 humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 2, por la cual dicha composición activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

4. Una muteína de IL-2 humana numerada de acuerdo con la IL-2 de tipo salvaje que tiene sustituciones en dos de las posiciones 20, 88, y 126, en la que

la posición 20 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: alanina, histidina, isoleucina, metionina, glutamina, serina, valina, o tirosina

la posición 88 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: alanina, arginina, ácido glutámico, histidina, lisina, leucina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, serina, treonina, tirosina o valina;

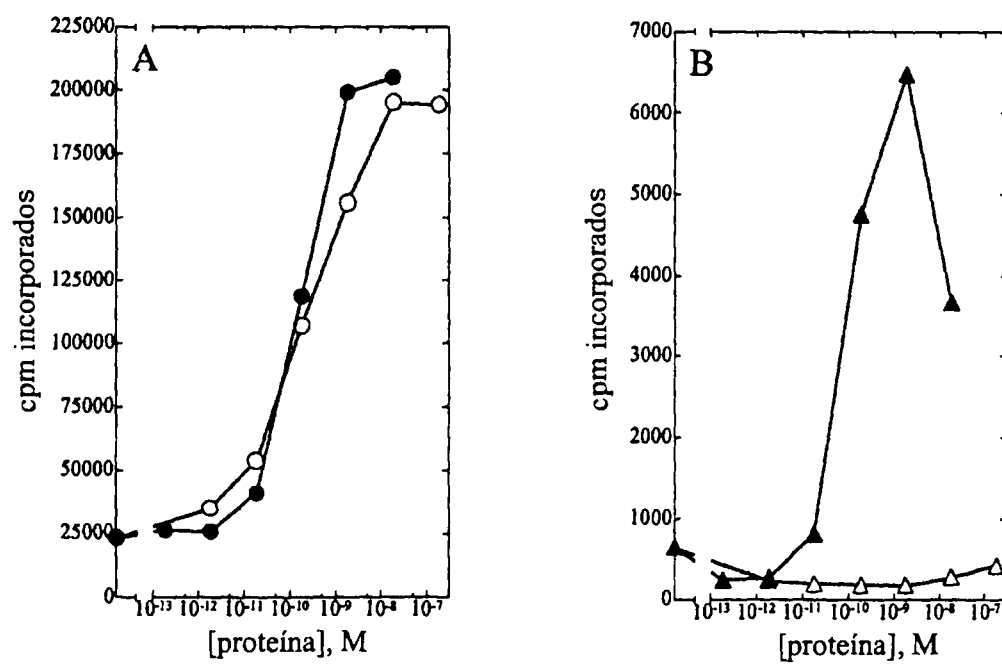
la posición 126 está sustituida por un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por: asparagina, leucina, prolina, fenilalanina, glicina, isoleucina, metionina, arginina, serina, treonina, tirosina o valina; y por lo cual dicha muteína de IL-2 activa de manera preferente las células T frente a las células Asesinas Naturales.

5. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ADN que codifica la muteína de IL-2 de cualquiera de las Reivindicaciones 1, 2 y 4.

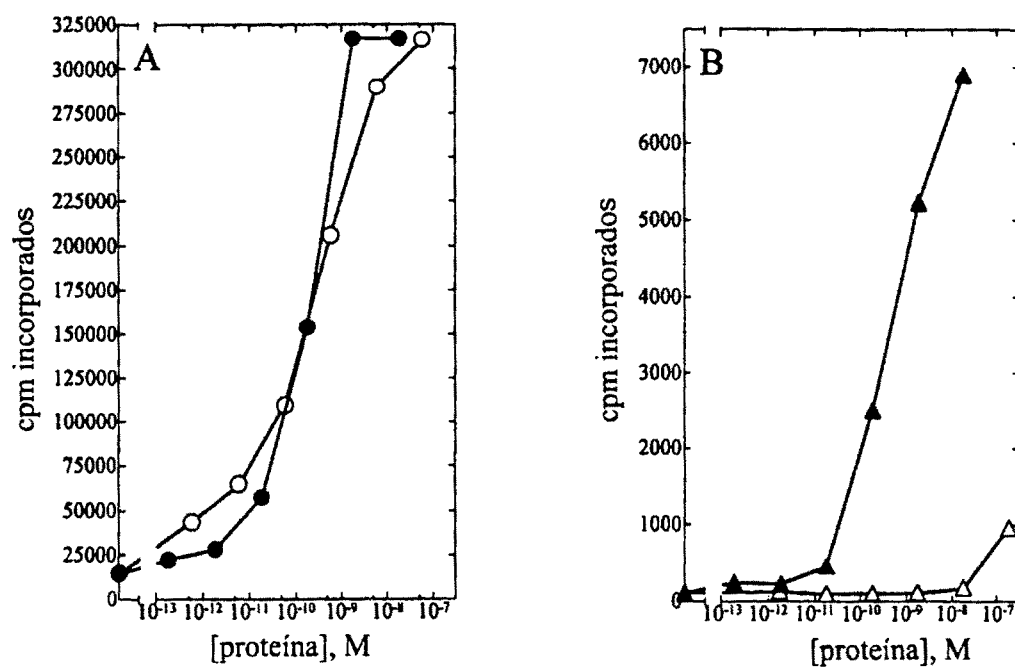
6. Un vector que comprende el polinucleótido de la Reivindicación 5.

7. Una célula eucariota aislada transformada con el vector de la Reivindicación 6.

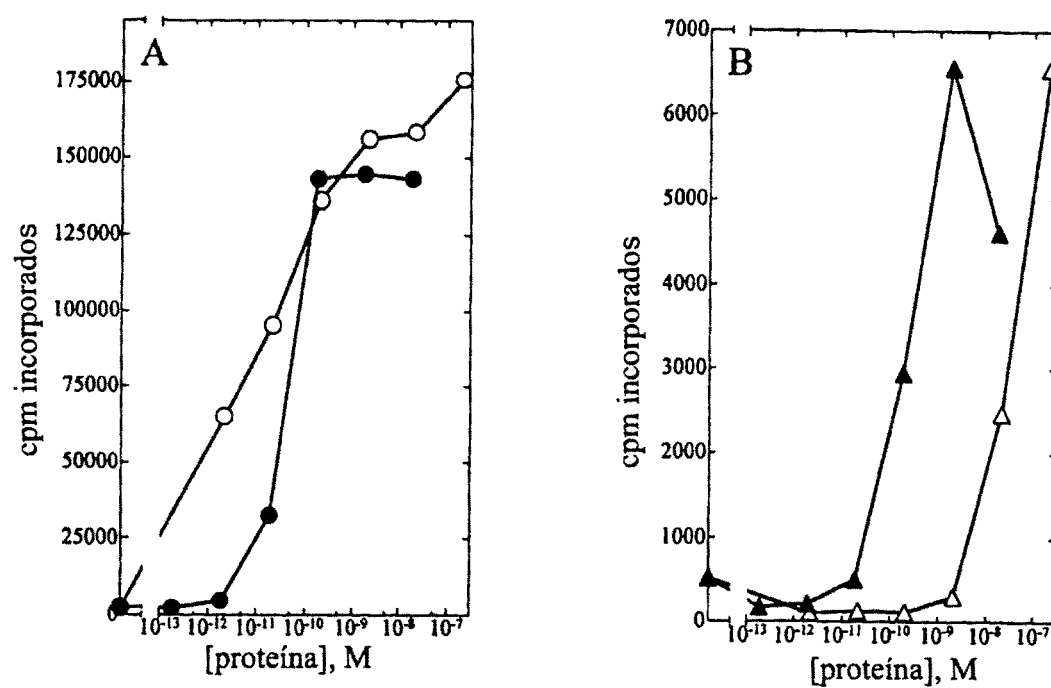
8. Una célula procariota transformada con el vector de la Reivindicación 6.



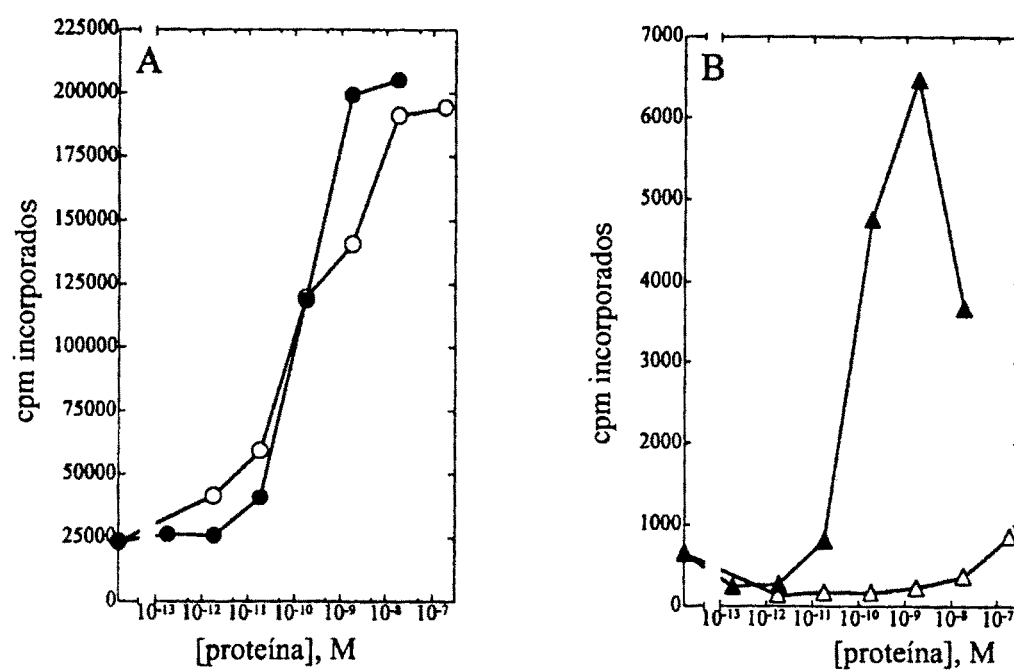
FIGURAS 1A – 1B



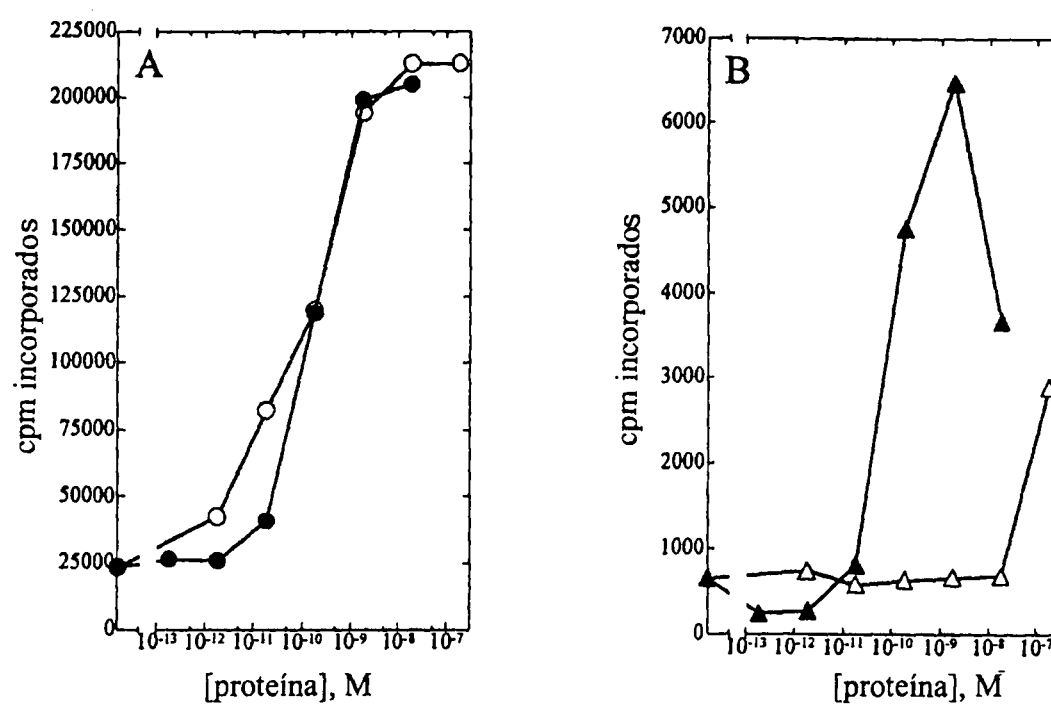
FIGURAS 2A – 2B



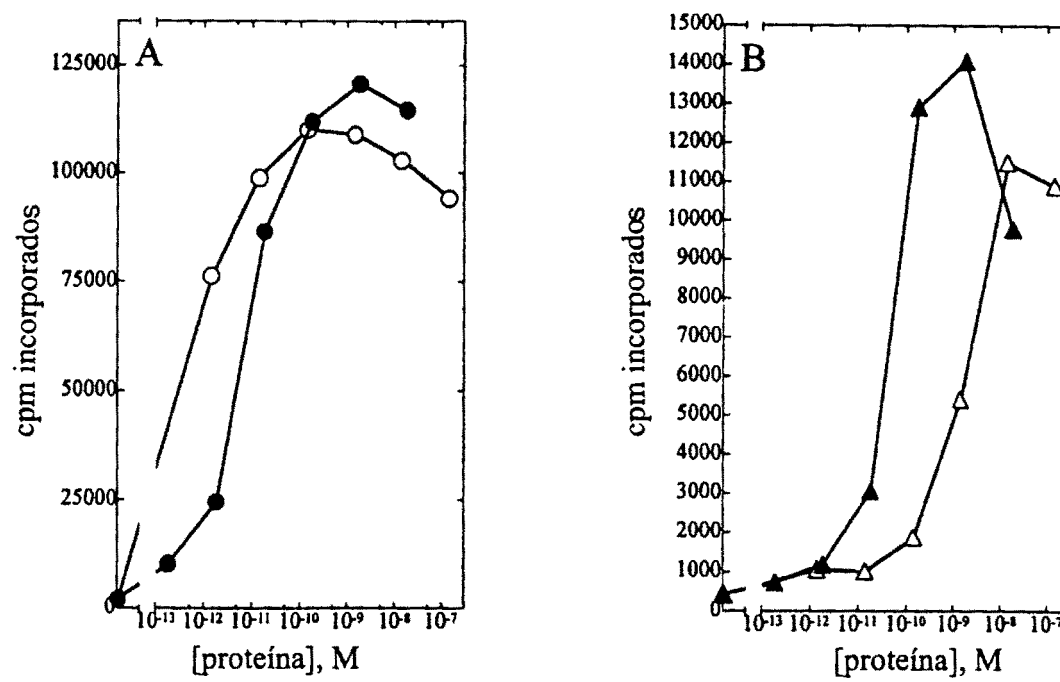
FIGURAS 3A – 3B



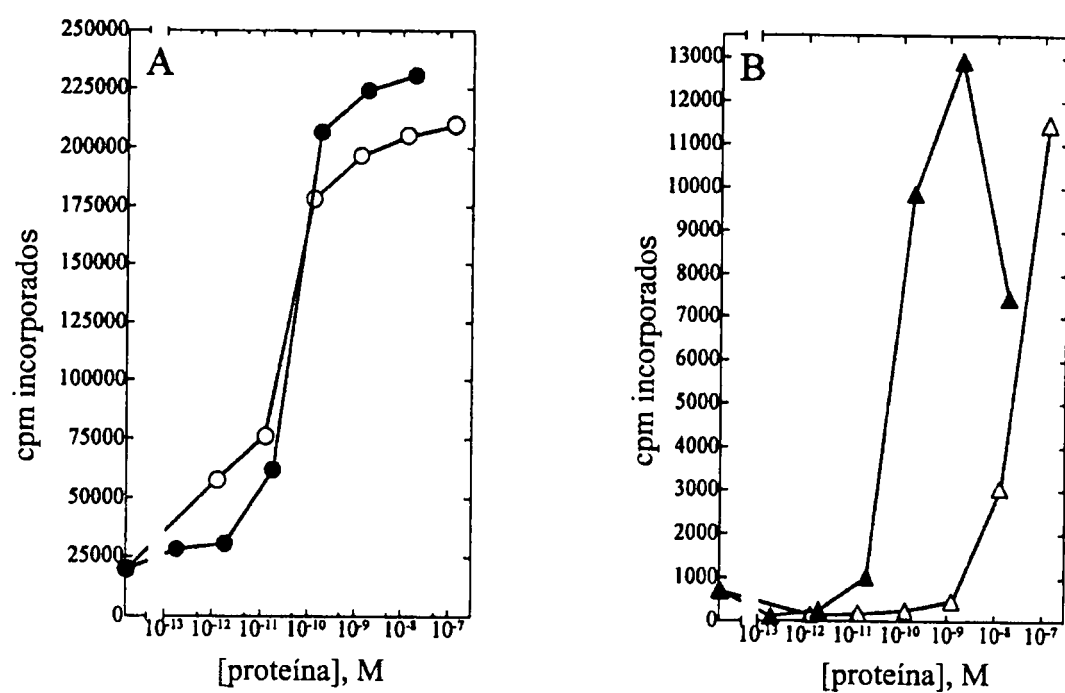
FIGURAS 4A – 4B



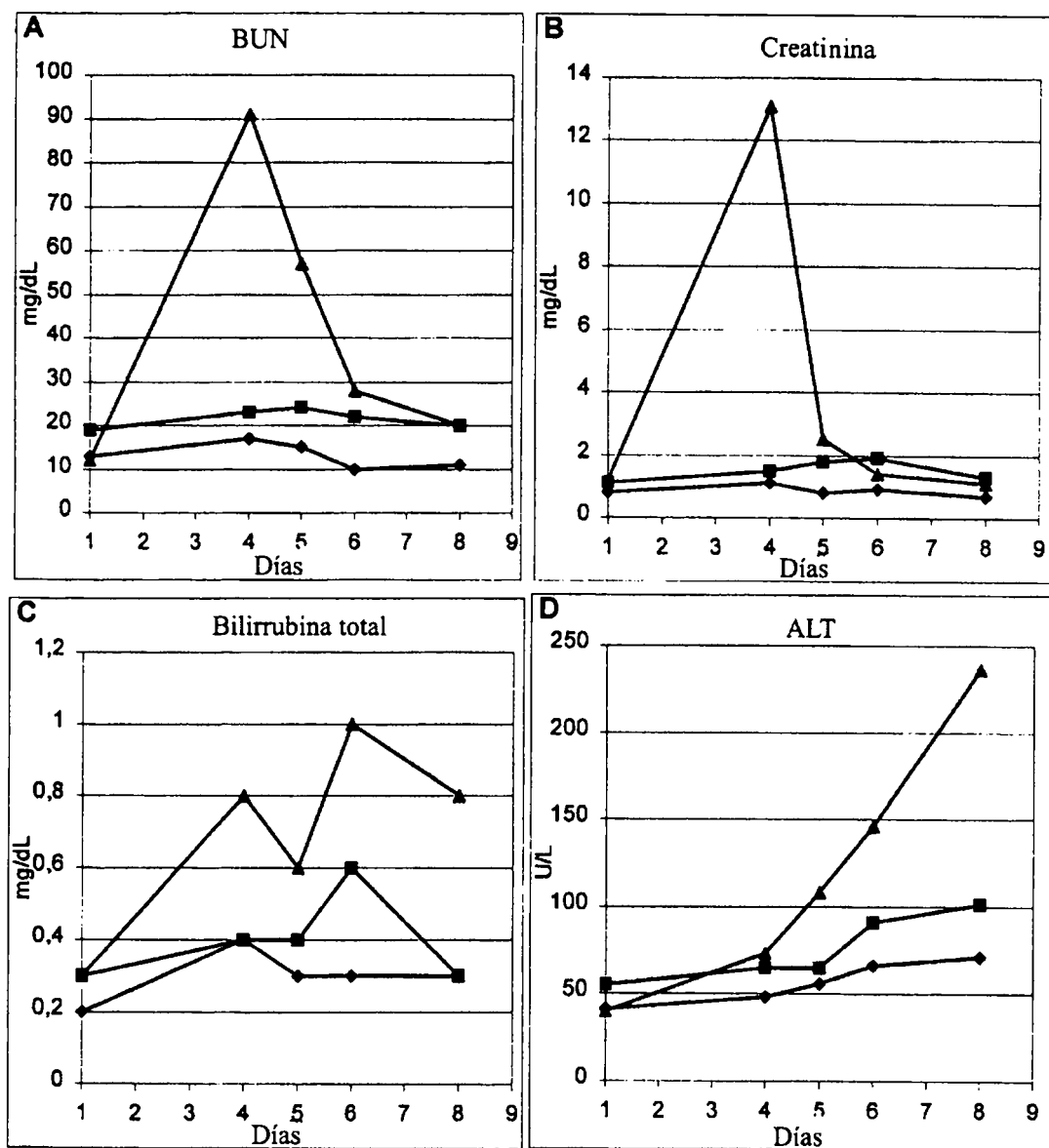
FIGURAS 5A – 5B



FIGURAS 6A – 6B



FIGURAS 7A – 7B



FIGURAS 8A – 8B

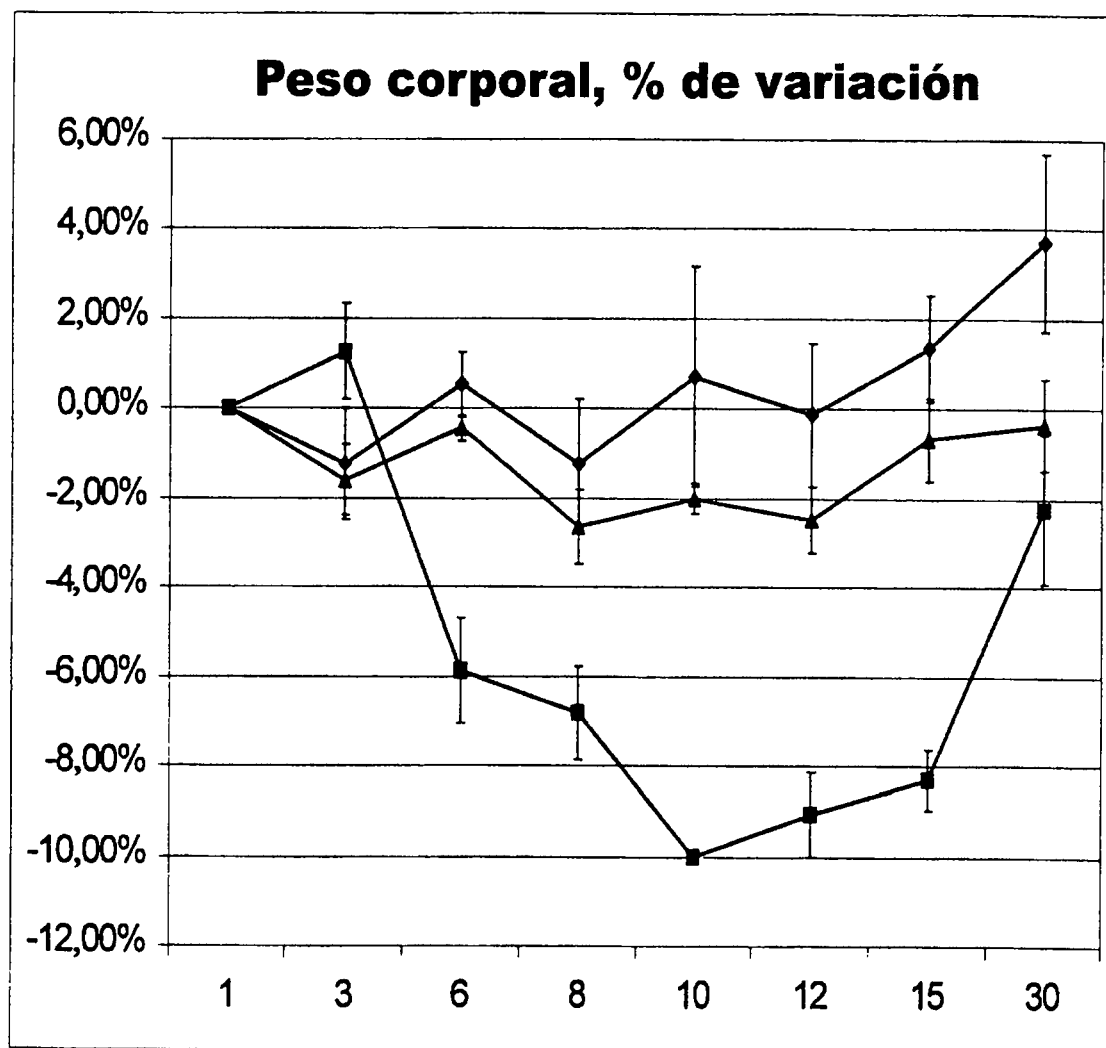
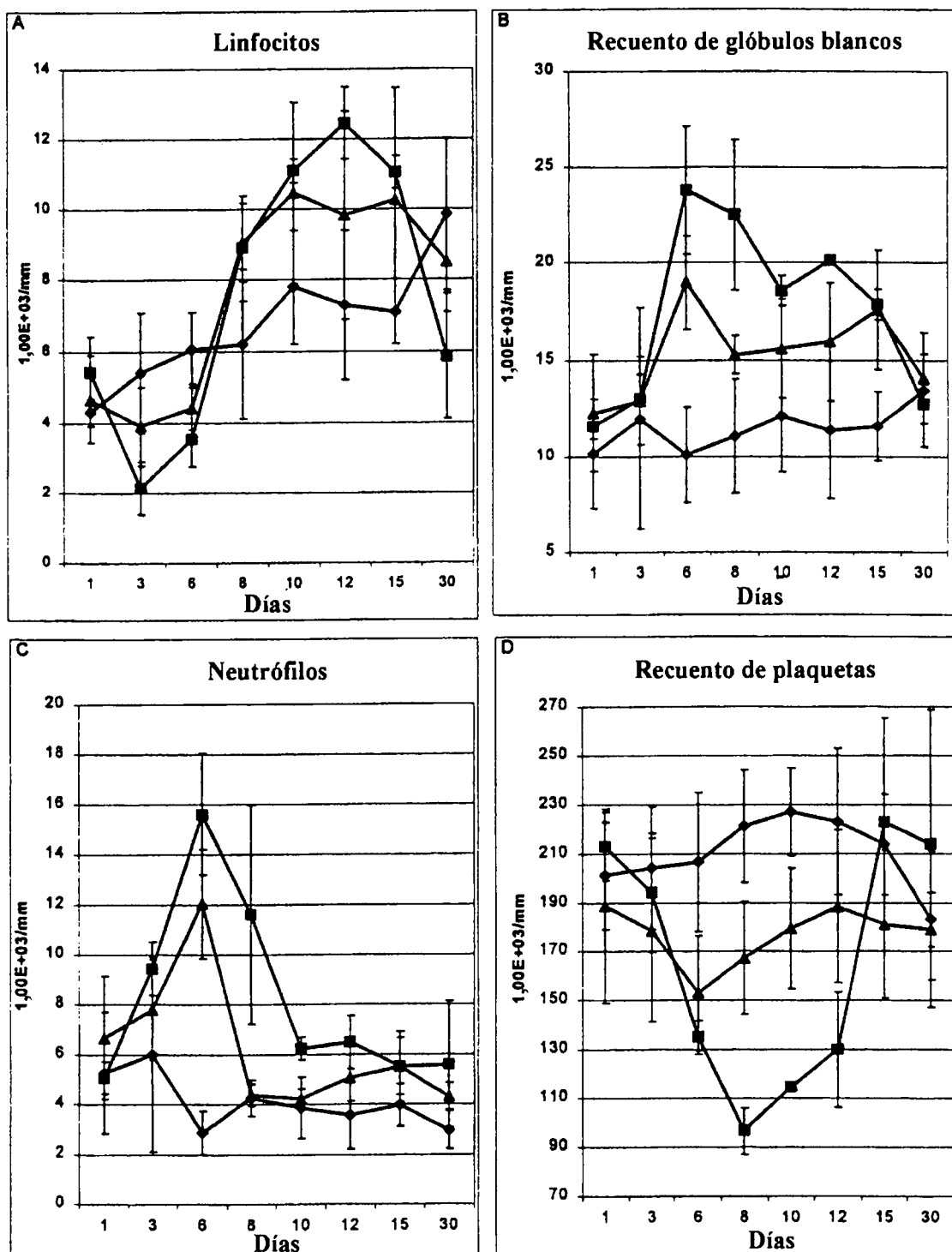
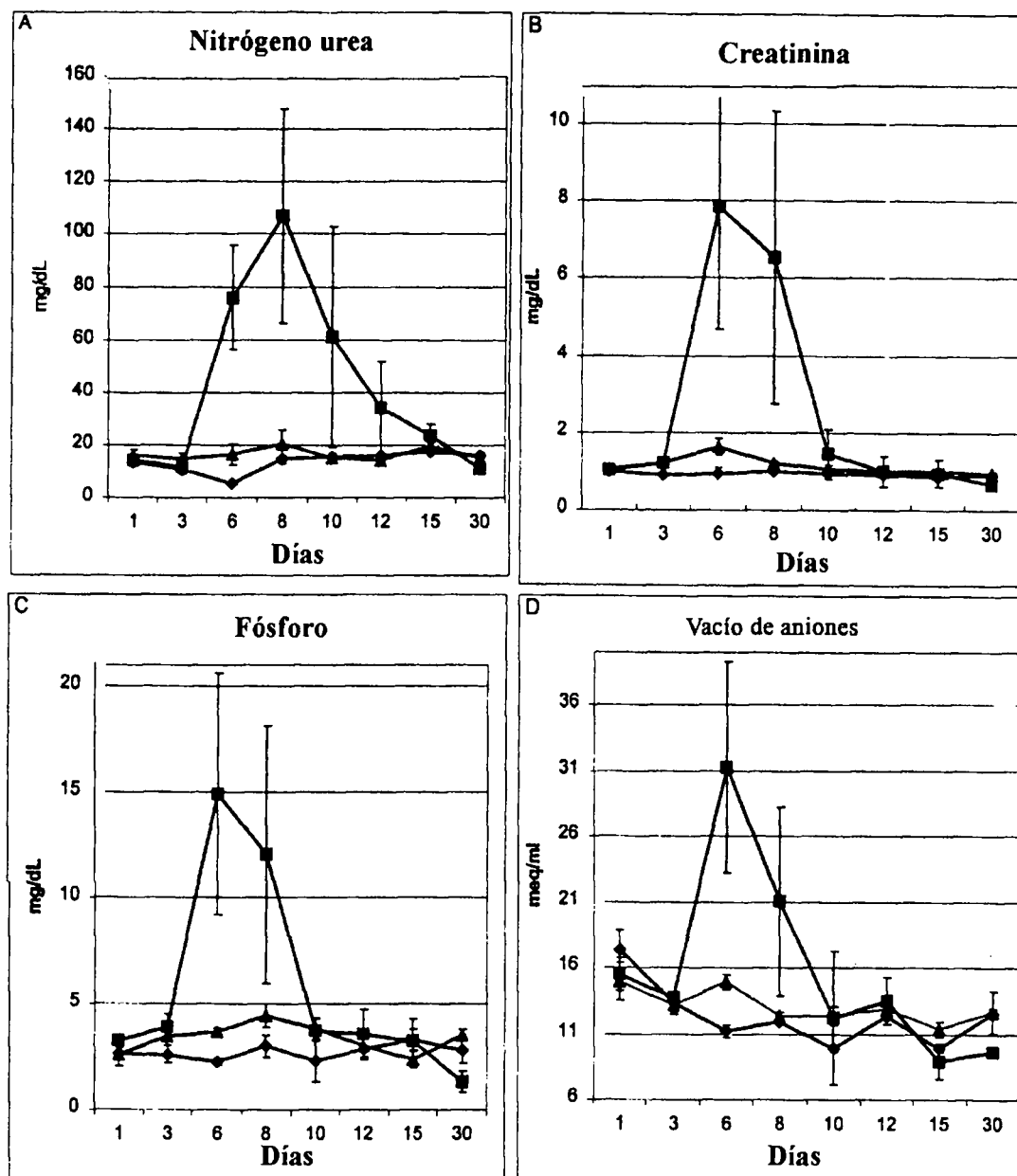


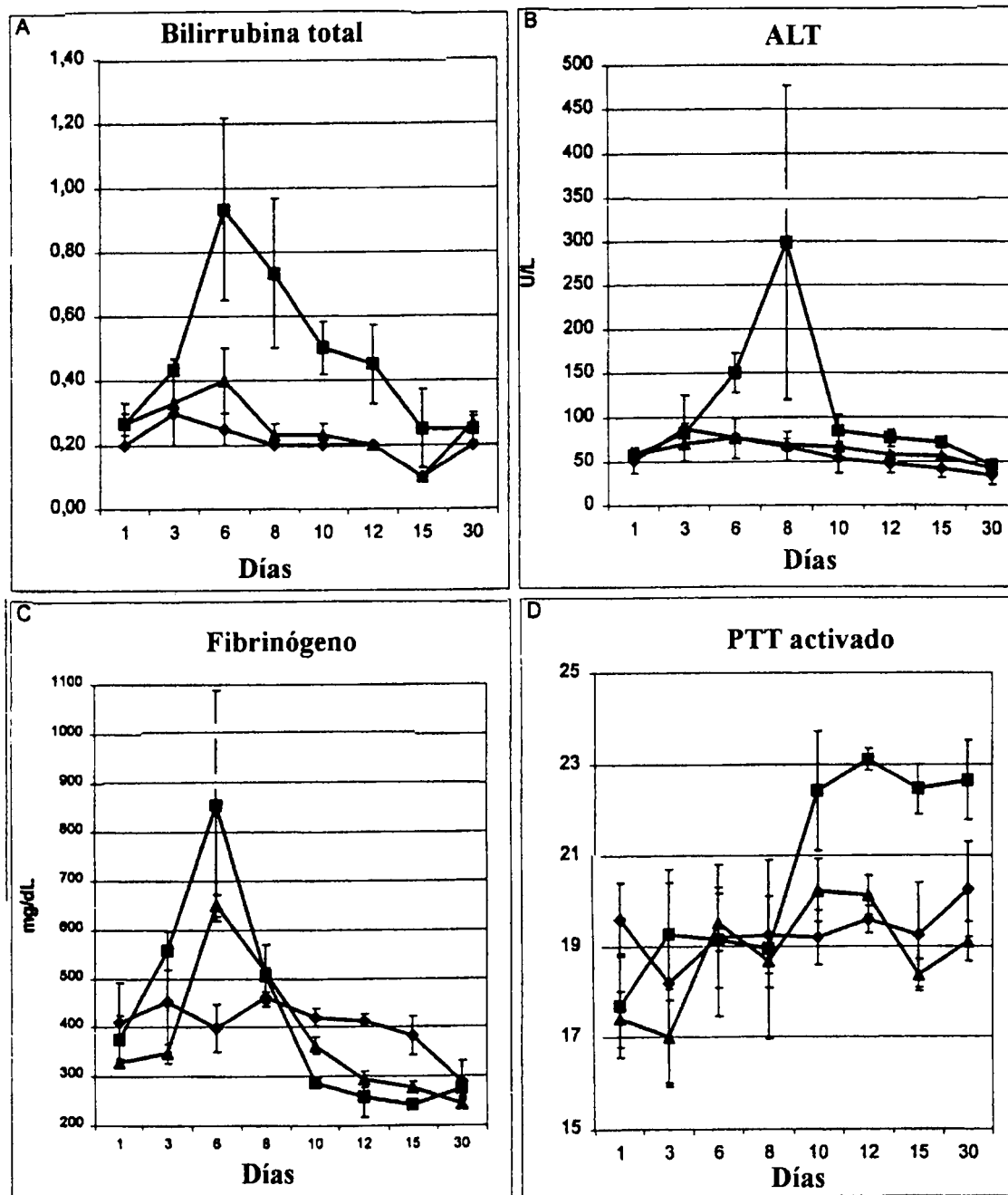
FIGURA 9



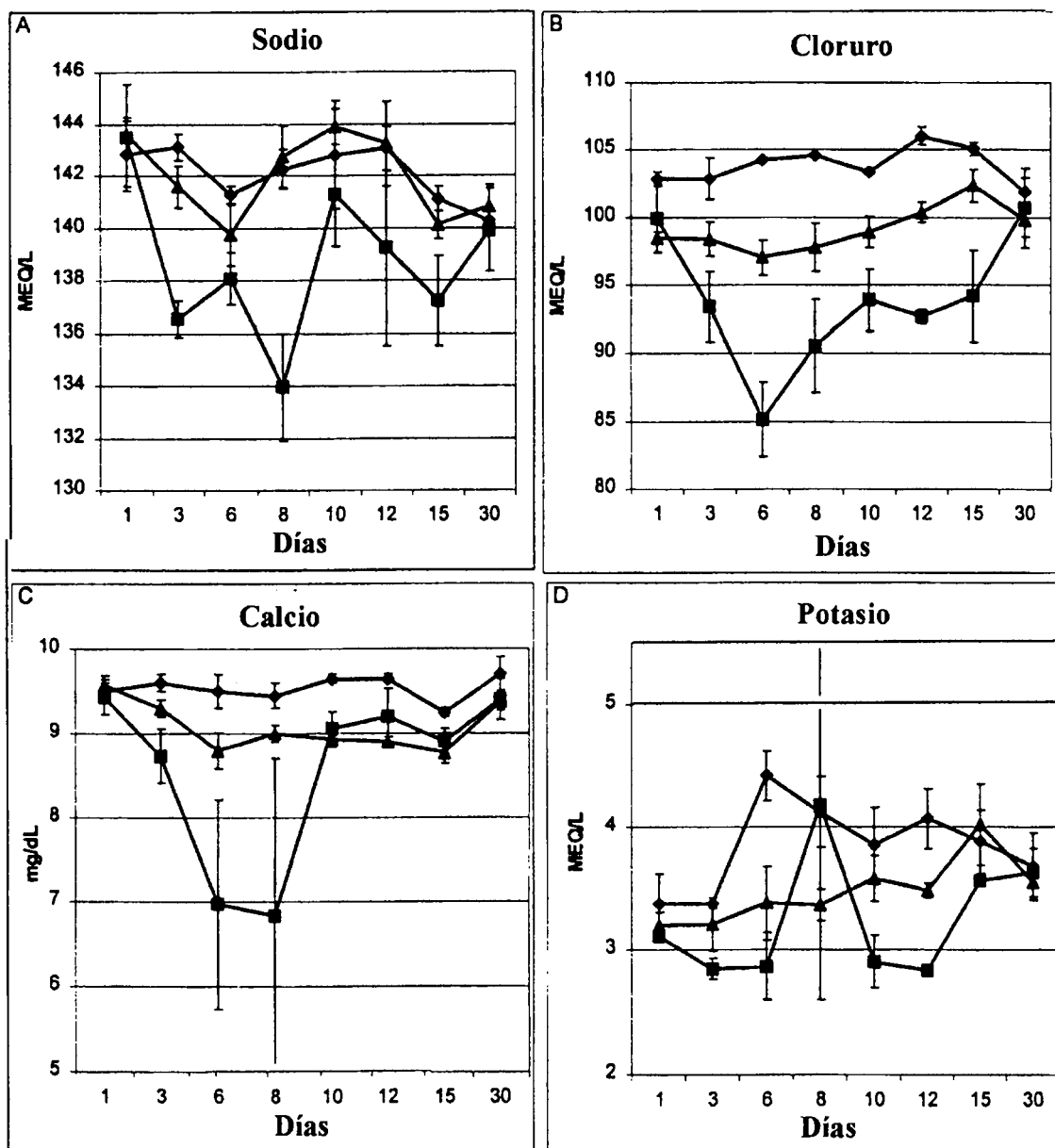
FIGURAS 10A – 10D



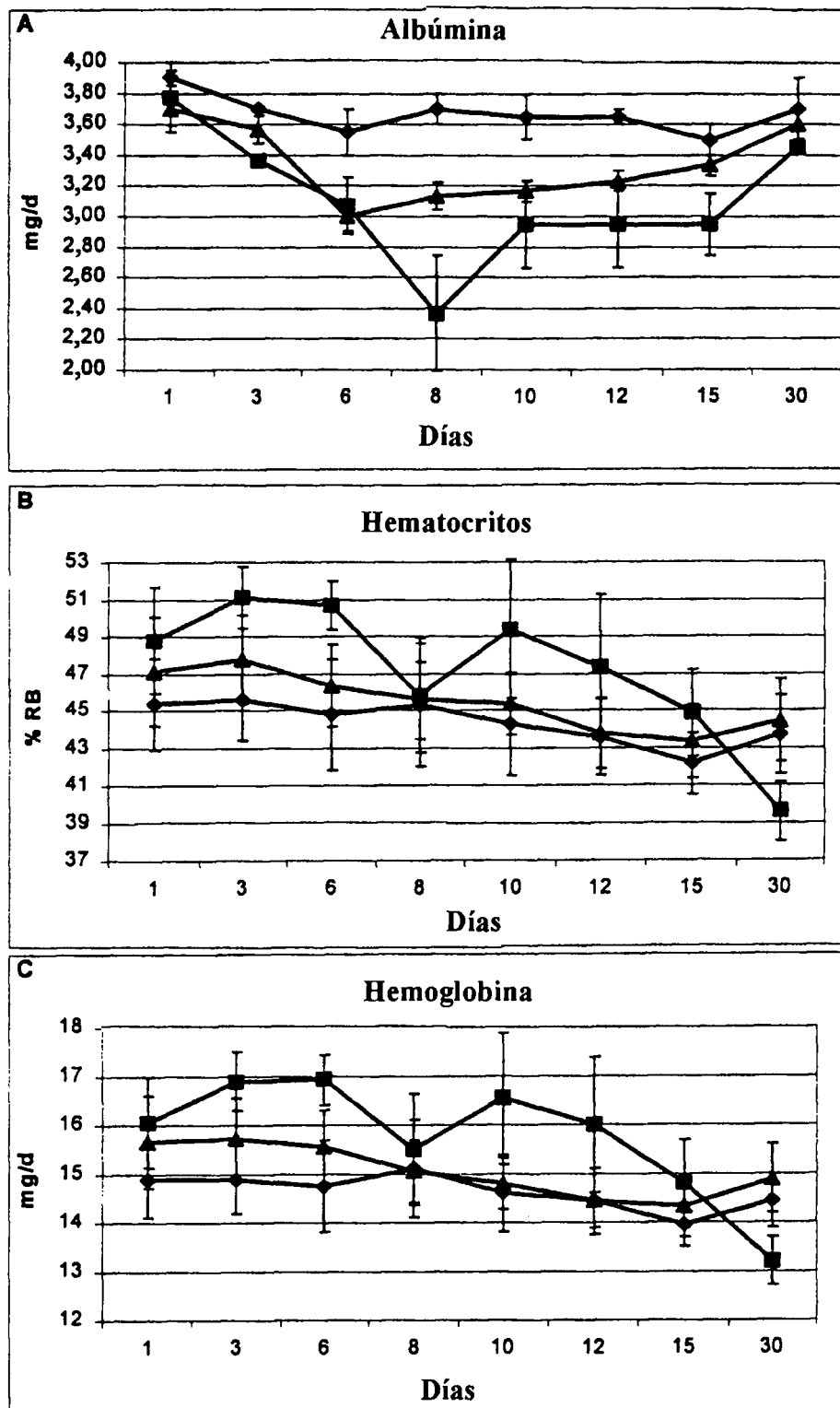
FIGURAS 11A – 11D



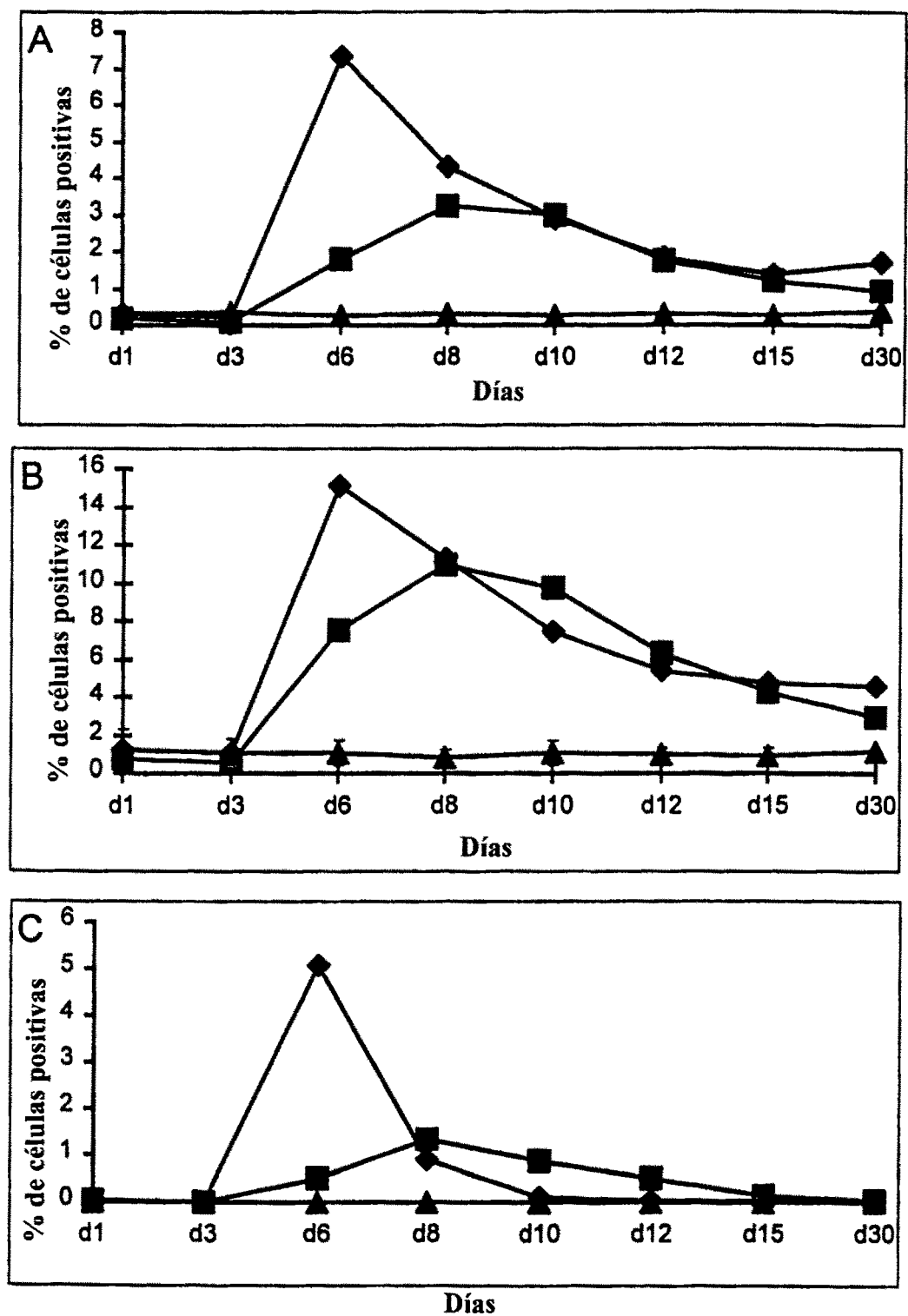
FIGURAS 12A – 12B



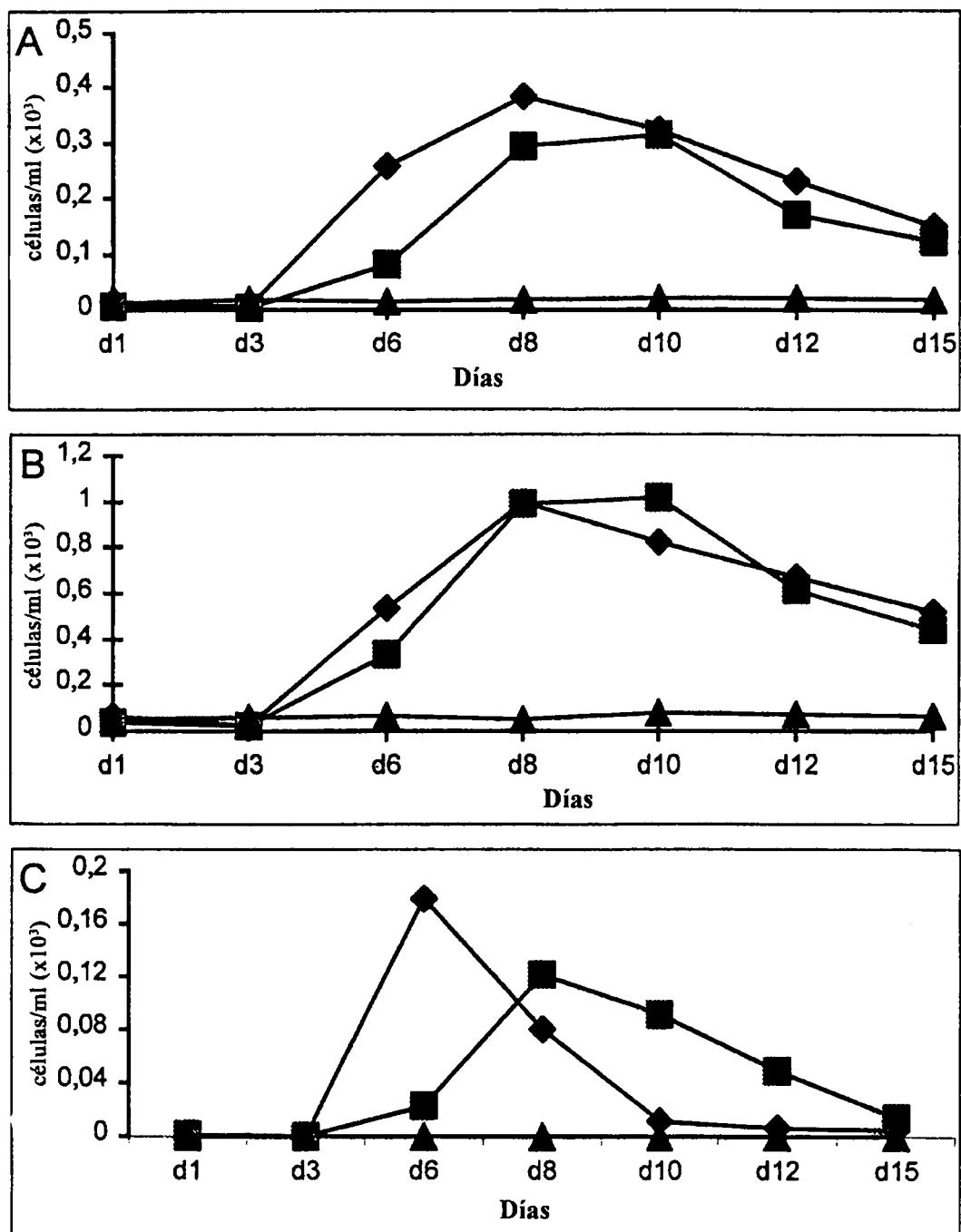
FIGURAS 13A – 13B



FIGURAS 14A – 14C



FIGURAS 15A – 15C



FIGURAS 16A – 16C

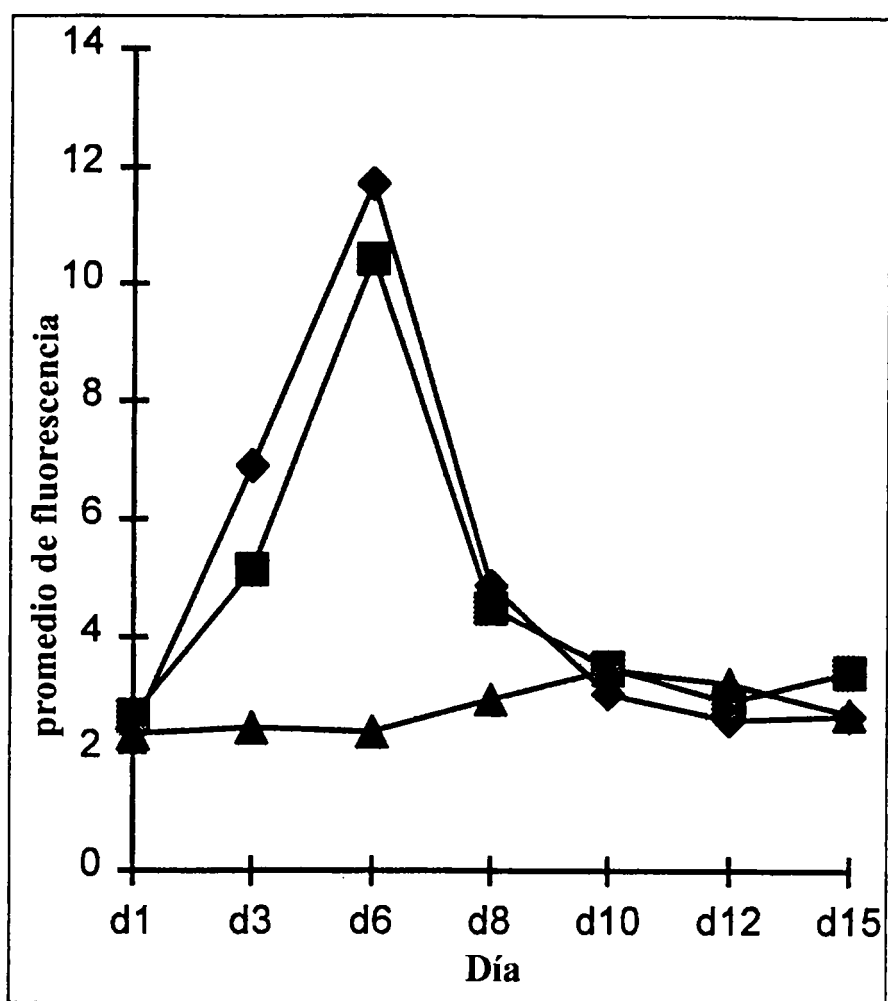


FIGURA 17

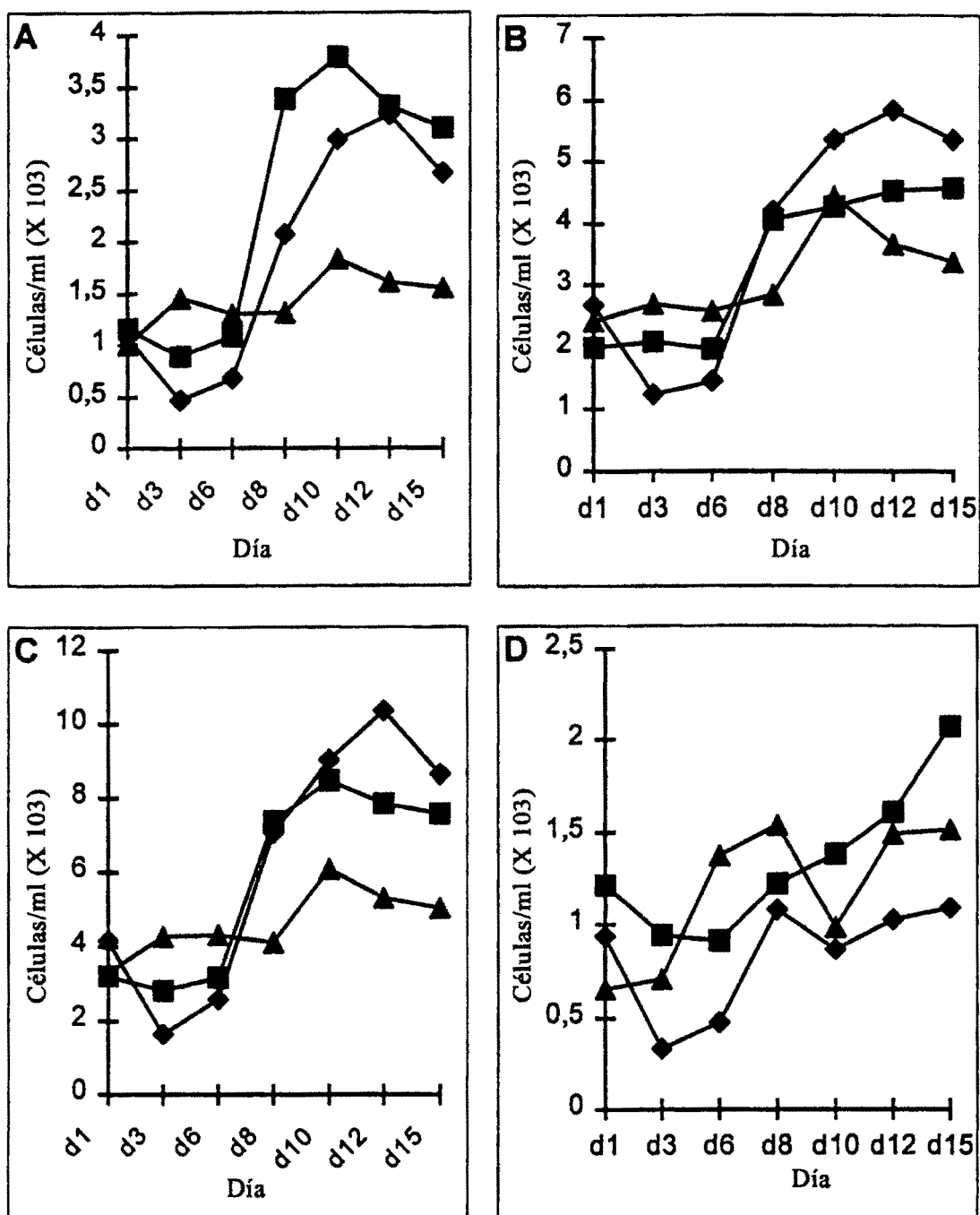


FIGURA 18A – 18D

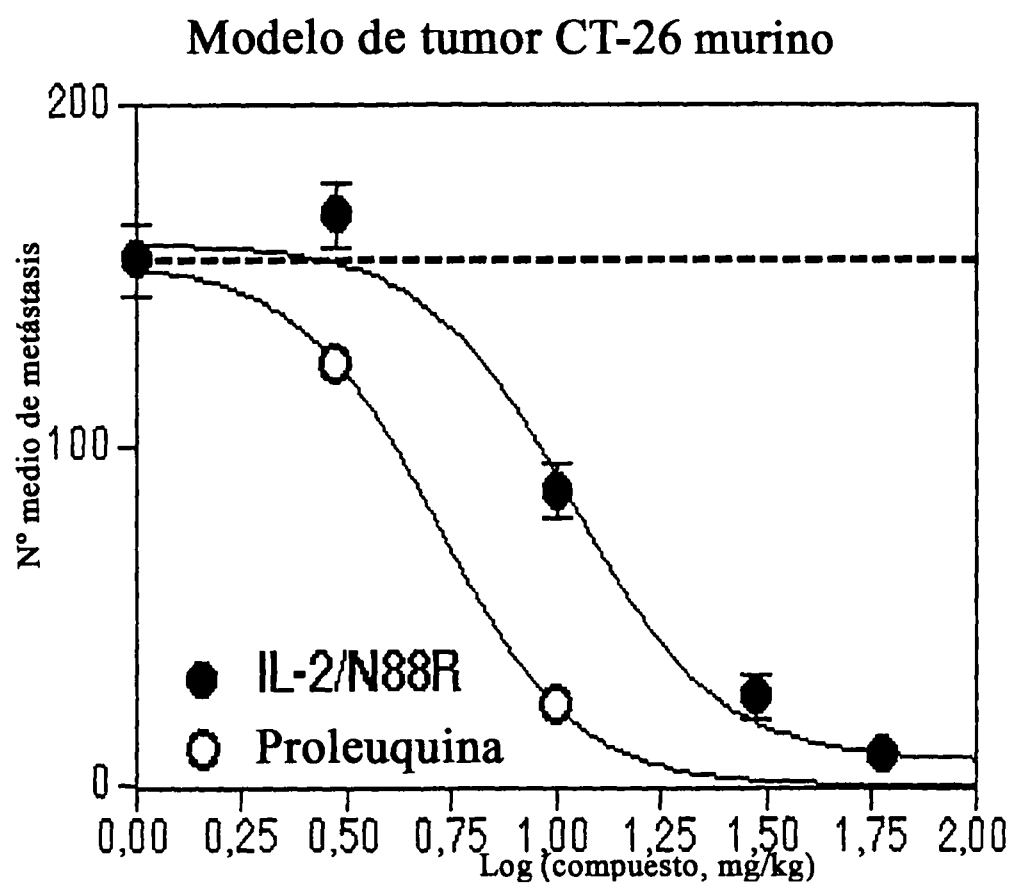


FIGURA 19

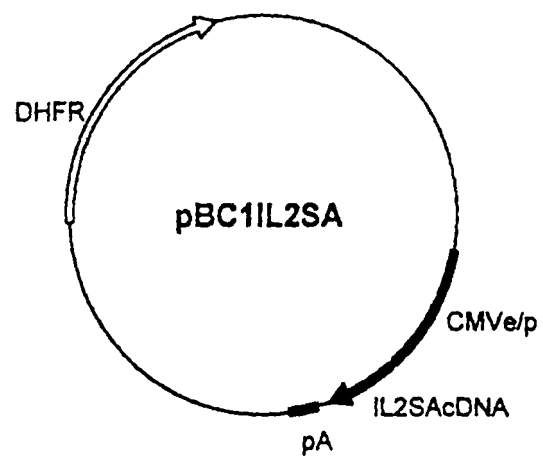


FIGURA 20

ES 2 281 175 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Shanafelt, Armen B
 Greve, Jeffrey M.
 5 Lembach, Kenneth J.
 Wetzel, Gayle D.
 <120> Agonistas y antagonistas selectivos de la IL-2
 <130> Secuencias ID 1-8 de la IL-2
 10 <140>
 <141>
 <150> 09/080.080
 <151> 15-05-1998
 15 <160> 8
 <170> PatetIn Ver. 2.0
 <210> 1
 20 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 1

 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 30 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 40 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 45 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 50 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 55
 <210> 2
 <211> 465
 60 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 65

ES 2 281 175 T3

<400> 2

5 atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120

10 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180
 acattttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 300
 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 360
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgactt gataa 465

15 <210> 3

<211> 30

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

25 cctcaactcc tgaattcatg tacaggatgc 30

<210> 4

<211> 31

<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

35 ggaagcggat ccttatcaag tcagtgtga g 31

<210> 5

<211> 36

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

45 gcacttgta caaacacat ggcacctact tcaagt 36

<210> 6

50 <211> 28

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55 <212> ADN

<400> 6

60 ggagcattta ctgctgnnt tacagatg 28

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 281 175 T3

<400> 7		
	gggacttaat cagcnnnatac aacgtaataag	30
5	<210> 8	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
15	ggattacctt ttgtnnnagc atcatctc	28
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		