

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 986 097**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 14/55** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2015 PCT/US2015/043792**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16022671**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2015 E 15750560 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3177307**

---

(54) Título: **Proteínas de fusión de interleucina-2/receptor alfa de interleucina-2 y métodos de uso**

---

(30) Prioridad:

**06.08.2014 US 201462033726 P**

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

**08.11.2024**

(73) Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)  
1951 NW 7th Avenue, Suite 110  
Miami, Florida 33136, US**

(72) Inventor/es:

**MALEK, THOMAS**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 986 097 T3**

---

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

---

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de interleucina-2/receptor alfa de interleucina-2 y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

La materia objeto divulgada en el presente documento se refiere en general a proteínas de fusión de interleucina 2/receptor alfa de interleucina-2 y a métodos y composiciones para modular la respuesta inmunitaria empleando dichas proteínas de fusión.

10

**Declaración de financiación federal**

La presente invención se realizó con financiación gubernamental en virtud de la subvención número RO1DK093866, concedida por el Instituto Nacional de Salud de los EE. UU. (NIH, por sus siglas en inglés), Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales de los EE. UU. (NIDDK, por sus siglas en inglés). El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

15

**Antecedentes de la invención**

20 La interleucina-2 (IL-2) es un producto biológico que se ha utilizado en intentos de estimular las respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer y VIH/SIDA. Más recientemente, se han utilizado dosis más bajas de IL-2 para estimular selectivamente la tolerancia y suprimir respuestas inmunitarias no deseadas asociadas a ataques de tipo autoinmunitario a los propios tejidos. De manera importante, estas dosis bajas de IL-2 no han mostrado ningún signo de potenciación o reactivación de los linfocitos T autorreactivos. Sin embargo, la IL-2 tiene importantes inconvenientes como agente terapéutico, incluyendo una semivida muy corta *in vivo*, lo que limita su eficacia, y toxicidad a dosis elevadas. Por estas razones, se necesitan nuevos productos biológicos de IL-2 que tengan una farmacocinética mejorada y durabilidad de las respuestas para su uso.

25

30 El desarrollo de proteínas de fusión de interleucina-2 atenuadas que pueden ser activadas por proteasas se describe en Puskas *et al.*, *Immunochemistry*. junio de 2011; 133(2): 206-220 y el documento WO 2011/123683. La proteína de fusión Albuleucina es una interleucina-2 humana recombinante fusionada genéticamente con albúmina sérica humana recombinante. Se dice que la eficacia terapéutica de la Albuleucina mejora en ratones mediante la prolongación de su semivida *in vivo* (Melder *et al.*, *Cancer Immunol Immunother*. Junio de 2005; 54(6):535-47). La fusión de citocinas con su receptor extracelular podría generar un agonista potente de acción prolongada con absorción y eliminación lentas (Wilkinson *et al.*, *Nat Med*. Septiembre de 2007; 13(9):1108-13).

35

**Sumario de la invención**

40 La presente invención se refiere en un primer aspecto a una proteína de fusión que comprende: (a) un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2); en donde el primer polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 (b) un segundo polipéptido, fusionado en fase de lectura con el primer polipéptido por un enlazador, en donde el enlazador es la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y en donde el segundo polipéptido comprende un dominio extracelular del receptor alfa de interleucina-2 (IL-2Ra), en donde el segundo polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; que tiene actividad biológica del dominio extracelular de IL-2Ra; en donde la proteína de fusión tiene una actividad IL-2 aumentada en comparación con la IL-2 nativa; o en donde la proteína de fusión tiene una estimulación por IL-2 persistente aumentada de linfocitos portadores de IL-2R *in vivo* en comparación con la IL-2 nativa.

45

50 En una segunda realización, el primer polipéptido que comprende IL-2 tiene al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

55 En una tercera realización, el segundo polipéptido que comprende el dominio extracelular de IL-2Ra tiene al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

En una cuarta realización, la proteína de fusión de la invención comprende (a) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 26, 27, 36, 37, 57 o 59; o (b) una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 26, 27, 36, 57 o 59.

60 En una quinta realización, la proteína de fusión comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62; o una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 62.

65 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el polinucleótido que codifica

la proteína de fusión de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método de producción de la proteína de fusión de la invención, comprendiendo el método expresar el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención en las células hospedadoras divulgadas en el presente documento y recuperar la proteína de fusión producida de este modo.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a la proteína de fusión de la invención para su uso en la disminución de la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite.

10 En una primera realización de dicho quinto aspecto, el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria; opcionalmente, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis sistémica, enfermedad de injerto contra hospedador, psoriasis, alopecia areata y vasculitis inducida por el VHC.

15 15 En una segunda realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión comprende de  $10^3$  a  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto o  $10^4 \pm 100$  veces de actividad IL-2 por adulto.

En una tercera realización, el sujeto es un ser humano.

20 20 En un sexto aspecto, la invención se refiere a la proteína de fusión de la invención para su uso en la potenciación de la inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto que lo necesite o para superar una respuesta inmunitaria suprimida a una vacuna en un sujeto que lo necesite.

25 En una primera realización de dicho sexto aspecto, la proteína de fusión y la vacuna han de administrarse simultáneamente.

En una segunda realización, la proteína de fusión y la vacuna han de administrarse secuencialmente en cualquier orden.

30 30 En una tercera realización, dicha vacuna es una vacuna contra el cáncer.

En una cuarta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión comprende al menos de  $10^4$  a  $10^7$  UI de actividad IL-2 por adulto o  $10^5 \pm 10$  veces de actividad IL-2 por adulto.

35 35 En una realización, el sujeto es un ser humano.

#### Breve descripción de los dibujos

40 La FIG. 1 proporciona un esquema de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra, donde L = péptido líder, LK = región enlazadora, G = glicina, H = histidina y T = codón de terminación.

La FIG. 2A y la FIG. 2B proporcionan las secuencias de proteínas deducidas de ejemplos no limitantes de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra. La FIG. 2A proporciona las secuencias de proteínas deducidas de ejemplos no limitantes de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra de ratón. Las secuencias de IL-2 e IL-2Ra de ratón se muestran arriba y abajo, respectivamente, de las proteínas de fusión. La secuencia indicada como IL-2 se expone en la SEQ ID NO: 3; la secuencia indicada como IL-2-(G4S)4-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 54; la secuencia indicada como IL-2-(G4S)5-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 55; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)4-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 56; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)3-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 57; y el dominio extracelular de IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 10. La FIG. 2B proporciona las secuencias de proteínas deducidas de ejemplos no limitantes de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra humanas. Las secuencias de IL-2 e IL-2Ra

45 humanos se muestran arriba y abajo, respectivamente, de las proteínas de fusión. La secuencia indicada como IL-2 se expone en la SEQ ID NO: 1; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)2-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 58; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)3-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 59; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)4-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 60; la secuencia indicada como IL-2-(G4S)4-IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 61; y el dominio extracelular de IL-2Ra se expone en la SEQ ID NO: 7.

50 La FIG. 3 muestra la bioactividad de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra. Se transfecaron células COS-7 con los ADNc de fusión IL-2/IL-2Ra con los enlazadores indicados. Los sobrenadantes de estas células se cultivaron con blastos de linfocitos T activados anti-CD3 para evaluar la actividad IL-2. (A) Respuestas proliferativas de los blastos T después de diluciones de las proteínas de fusión indicadas. (B) Efecto de anti-IL-2 sobre la proliferación estimulada por una dilución 1:2 del sobrenadante de cultivo que contiene las proteínas de fusión indicadas.

55 La FIG. 4 muestra la actividad de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra purificadas. Se usaron sobrenadantes de células CHO transfectadas para purificar IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2Ra e IL-2/(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>/IL-Ra mediante cromatografía de afinidad basada en Níquel contra el marcador 6x-His. (A) Medida de bioactividad de IL-2 mediante proliferación de blasto de linfocito T anti-CD3 contra la proteína de fusión purificada indicada. (B) El efecto de cada proteína de fusión purificada para inhibir la unión de los anticuerpos monoclonales anti-IL-2Ra PC61 y 7D4, dirigidos al sitio de no unión a ligando, a blastos de linfocitos T activados anti-CD3.

La FIG. 5 muestra que un anticuerpo anti-IL-2Ra monoclonal que se dirige al sitio de unión de IL-2 de IL-2Ra no puede unirse a la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra. Las proteínas de fusión purificadas con enlazadores variables, como se indica, se incubaron primero con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2Ra 3C7, dirigido al sitio de unión a ligando de IL-2Ra, o el anticuerpo monoclonal 7D4, dirigido a un sitio no de unión a ligando de IL-2Ra. La capacidad de 3C7 o 7D4 para después unirse a IL-2Ra de superficie celular se evaluó usando células EL4 transfectadas con IL-2Ra.

La FIG. 6 muestra las propiedades bioquímicas de IL-2/IL-2Ra purificada. (A) La IL-2/IL-2Ra purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras; IL-2/IL-2Ra se visualizó mediante análisis por transferencia Western sondando con un anticuerpo dirigido al marcador 6x-His de la proteína de fusión. (B) La cantidad indicada de IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie.

La FIG. 7 muestra el efecto de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra sobre la transducción de señales dependiente de IL-2 *in vivo*. Los ratones C57BL/6 recibieron una única inyección i.p. de IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2Ra (4000 unidades de actividad IL-2) y los niveles de pSTAT5 en las poblaciones de células del bazo indicadas se evaluaron inmediatamente. Los niveles de pSTAT5 se determinaron 0,5 horas después de la inyección de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra. Para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células se sometieron a selección para excluir linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup>.

La FIG. 8 muestra el efecto de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra en linfocitos Treg *in vivo*. A ratones NOD se les inyectó por vía i.p. 3 veces (día 1, 3, 5) la cantidad indicada de actividad IL-2 asociada a IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2Ra. Se evaluó el efecto sobre los Treg para el bazo, los ganglios linfáticos pancreáticos (PLN, por sus singlas en inglés) y el páncreas 24 horas después de la última inyección. Se evaluó la proporción de Treg en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la intensidad fluorescente media (MFI, por sus siglas en inglés) para la expresión de CD25 por Treg después de la normalización a la expresión de CD25 por Treg de ratones tratados con control; el estado proliferativo de Treg evaluado mediante la expresión del marcador proliferativo Ki67; y el % de Treg que expresaron Klrg1, lo que marca una subpoblación terminalmente diferenciada dependiente de IL-2.

La FIG. 9 muestra la comparación de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra y la IL-2 recombinante para inducir cambios en los linfocitos Treg *in vivo*. A ratones C57BL/6 se les inyectó por vía i.p. 3 veces (día 1, 3, 5) IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2Ra (2000 Unidades), IL-2 humana recombinante (25.000 Unidades) o complejos preformados de anti-IL-2 (Jes-6.1; 5 µg) e IL-2 de ratón (10.000 Unidades) (IL2/IC). El efecto sobre los Treg se evaluó para el bazo 24, 72 horas y 1 semana después de la última inyección. Los Treg se evaluaron como se describe en la FIG. 8.

La FIG. 10 muestra que la aplicación limitada de IL-2 a dosis bajas retrasa la diabetes en ratones NOD. Los ratones NOD (8 ratones/grupo) recibieron IL-2/IL-2Ra, IL-2Ra soluble o PBS de acuerdo con el programa en (A). Se controlaron los niveles de glucosa en orina y sangre hasta que los ratones alcanzaron las 40 semanas de edad. Los ratones se consideraron diabéticos después de 2 lecturas consecutivas de niveles de glucosa >250 mg/dl.

La FIG. 11 demuestra que IL-2/IL-2Ra a dosis alta potencia el desarrollo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria. Los ratones C57BL/6 recibieron linfocitos T transgénicos de receptores de linfocitos T OT-I específicos de ovoalbúmina (OVA) restringidos de clase I congénicos. Estos ratones se inmunizaron y se trataron con una aplicación única de proteína de fusión IL-2/(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>/IL-2Ra, IL2/IC que contiene 15.000 unidades de IL-2, o IL-2 recombinante (25.000 unidades). En los momentos indicados, se evaluó la proporción relativa de linfocitos T OT-I dentro del compartimento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales en sangre periférica.

La FIG. 12 muestra el tipo de células de memoria OT-I persistentes sustentadas por la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra a dosis altas: (A) Estrategia de selección para identificar células de memoria efectora (EM, por sus siglas en inglés) y de memoria central (CM, por sus siglas en inglés). (B) Distribución de células de memoria OT-1 28 y 202 días después de la inmunización para ratones que también recibieron IL-2/IL-2Ra (12.000 unidades).

La FIG. 13 muestra la caracterización de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra humanas que contienen enlazadores de glicina/serina de longitud variable, como se muestra. (A) Bioactividad IL-2 de IL-2/IL-2Ra humana purificada usando el bioensayo de CTL. (B) Análisis por transferencia Western de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra humanas después de SDS-PAGE en condiciones reductoras.

La FIG. 14 muestra la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra humana que se une a anticuerpos monoclonales anti-IL-2Ra. Las proteínas de fusión purificadas con los enlazadores indicados se incubaron primero con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2Ra BC96, dirigido a la región de unión a ligando del IL-2R humano, o el anticuerpo monoclonal MA257, dirigido a una región no de unión a ligando del IL-2Ra humano. La capacidad de BC96 o M-A257 para después unirse a IL-2Ra de superficie celular se evaluó usando células CHO transfectadas con IL-2Ra.

La FIG. 15 muestra que IL-2 interactúa con el sitio de unión a IL-2 de IL-2Ra en el contexto de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra humanas. La bioactividad de IL-2 de las proteínas de fusión indicadas con enlazadores de glicina/serina variables se evaluó usando células CTL. Mut se refiere a proteínas de fusión donde IL-2Ra contenía mutaciones Arg<sup>35</sup> → Thr, Arg<sup>36</sup> → Ser. El análisis por transferencia Western confirmó cantidades similares de todas las proteínas de fusión (no se muestra).

## 60 Descripción detallada de la invención

Las presentes invenciones se describirán ahora más detalladamente en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones de la invención.

65 De hecho, estas invenciones pueden realizarse de muchas formas diferentes y no deben interpretarse como limitadas a las realizaciones expuestas en el presente documento; más bien, estas realizaciones se proporcionan de manera

que la presente divulgación satisfaga los requisitos legales aplicables. Números similares se refieren a elementos similares en todo el documento.

5 A una persona experta en la materia a la que pertenecen estas invenciones que tenga el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados se le ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en el presente documento. Por lo tanto, ha de entenderse que las invenciones no han de limitarse a las realizaciones específicas divulgadas y que se pretenden incluir modificaciones y otras realizaciones en el ámbito de la presente invención que se define en las reivindicaciones adjuntas. Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y  
10 no con fines de limitación.

#### I Visión general

15 La tecnología actual se basa en el uso de interleucina-2 (IL-2) recombinante, que tiene propiedades farmacológicas deficientes, especialmente una semivida corta que limita su utilidad. En el presente documento se divultan proteínas de fusión interleucina-2/receptor alfa de interleucina-2 (IL-2/IL-2Ra) que tienen propiedades intrínsecas que las separan de la IL-2 recombinante y de otras proteínas de fusión de IL-2. En primer lugar, el tamaño de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra aumentará su semivida *in vivo*. En segundo lugar, la interacción débil entre IL-2 e IL-2Ra (una subunidad del IL-2R) en el contexto de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra proporciona otro mecanismo para prolongar  
20 la disponibilidad de la IL-2. Aunque sin limitarse al mecanismo de acción específico, la disponibilidad prolongada de la actividad IL-2 podría ocurrir a través de una interacción competitiva entre el resto IL-2 con IL-2Ra de la fusión IL-2/IL-2Ra y con células que expresan la IL-2R.

#### II. Proteínas de fusión Interleucina-2/Receptor Alfa de Interleucina-2 y polinucleótidos que codifican las mismas

25 En el presente documento se divultan proteínas de fusión que comprenden un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2), o una variante o fragmento funcional de la misma, fusionado en fase de lectura a un segundo polipéptido que comprende o consiste en el dominio extracelular del polipéptido del receptor alfa de interleucina-2 (IL-2Ra), o una variante o fragmento funcional del mismo. De acuerdo con la invención, la proteína de fusión comprende  
30 un primer polipéptido que comprende IL-2 y que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; y un segundo polipéptido, fusionado en fase de lectura con el primer polipéptido por un enlazador, en donde el enlazador es la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y en donde el segundo polipéptido comprende un dominio extracelular del receptor alfa de interleucina-2 (IL-2Ra), en donde el segundo polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; que tiene actividad biológica del dominio extracelular de IL-2Ra.  
35

Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión" se refiere la unión genética en fase de lectura de al menos dos polipéptidos heterólogos. Tras la transcripción/traducción, se produce una única proteína. De esta manera, pueden incorporarse múltiples proteínas, o fragmentos de las mismas, en un único polipéptido. Se entiende que "unido operativamente" significa una unión funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, una unión operativa entre dos polipéptidos fusiona ambos polipéptidos entre sí en fase de lectura para producir una proteína de fusión de un único polipéptido. En un aspecto particular, la proteína de fusión comprende además un tercer polipéptido que, como se analiza con más detalle a continuación, puede comprender una secuencia enlazadora.  
40

45 Las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra, o las variantes o fragmentos activos de las mismas, divulgadas en el presente documento pueden tener una o más de las siguientes propiedades/actividades: (1) aumento de la actividad de los linfocitos T reguladores (Treg) y/o aumentar la tolerancia inmunitaria en terapias basadas en IL-2 a dosis bajas; (2) aumento de la respuesta inmunitaria y la memoria en terapias a dosis más altas; (3) aumento de la disponibilidad de IL-2 en comparación con la IL-2 recombinante, y/o (4) aumento de la estimulación persistente de IL-2 de linfocitos portadores de IL-2R *in vivo*. Dicha actividad y métodos de ensayo se divultan con mayor detalle en otra parte del presente documento. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 proporcionado en el presente documento. De acuerdo con la invención, la proteína de fusión tiene una mayor actividad IL-2 o una mayor estimulación persistente de IL-2 de linfocitos portadores de IL-2R *in vivo*, en comparación con la IL-2 nativa.  
50

55 En una realización no limitante, una actividad aumentada de Treg que es resultado de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra, o las variantes o fragmentos activos de las mismas, divulgadas en el presente documento se puede someter a ensayo de diversas maneras, incluyendo, por ejemplo, (1) una representación y un número aumentados de Treg en el compartimento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>; (2) regulación positiva de CD25 dependiente de IL-2; (3) proliferación aumentada según lo evaluado mediante la expresión del marcador proliferativo Ki67; y (4) una fracción aumentada del subconjunto de Treg KIrgI<sup>+</sup> diferenciados terminalmente dependientes de IL-2. Pueden observarse dichos efectos sobre los Treg, por ejemplo, en el bazo y el páncreas inflamado.  
60

65 En una realización no limitante, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra, o las variantes o fragmentos activos de las mismas, divulgadas en el presente documento aumentan los Treg tolerogénicos e inmunosupresores y la inmunidad a través del aumento de las respuestas efectoras/de memoria T y, en realizaciones adicionales, presentan una farmacocinética mejorada mediante el suministro de dichas respuestas a (1) niveles eficaces más bajos de actividad IL-2 en comparación con la IL-2 nativa o recombinante; (2) muestra respuestas biológicas más persistentes que la IL-2 nativa

o recombinante; y/o (3) conserva la jerarquía con Treg que responden a dosis de nivel más bajo que los linfocitos T efectores/de memoria.

- 5 En realizaciones específicas, las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento tienen una actividad mejorada sobre la IL-2 nativa o recombinante. Por ejemplo, el efecto de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra puede aumentar los Treg tolerogénicos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces o un nivel más bajo de actividad IL-2 en comparación con la IL-2 nativa o recombinante. En otras realizaciones, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento son más eficaces que la IL-2 nativa o recombinante para inducir un aumento persistente de Treg y propiedades relacionadas.

10 Pueden usarse diversos fragmentos y variantes de IL-2 e IL-2Ra de una diversidad de organismos para generar las proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-2Ra divulgadas en el presente documento. Dichos componentes se analizan con mayor detalle en otra parte del presente documento. Se exponen ejemplos no limitantes de proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-2Ra sin procesar en las SEQ ID NO: 27, 36, 57 y 59, mientras que se exponen ejemplos no limitantes de formas maduras de las proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-Ra en las SEQ ID NOS: 26, 37 y 62. Se exponen ejemplos no limitantes de polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión en las SEQ ID NO: 33, 34, 42 y 63. La expresión "secuencia señal secretora" indica una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido más grande, dirige el polipéptido más grande a través de una vía secretora de la célula en la que se sintetiza. El polipéptido más grande habitualmente se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora. Como se usa en el presente documento, una forma "madura" de una proteína o polipéptido de fusión comprende la forma procesada del polipéptido al que se le ha eliminado el péptido secretor. Como se usa en el presente documento, la forma "sin procesar" de la proteína de fusión conserva la secuencia peptídica secretora. También se divulan fragmentos y variantes biológicamente activos de la forma madura y sin procesar de las proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-Ra, y el polinucleótido que codifica las mismas. Una variante de polipéptido funcional de este tipo puede comprender al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 26, 27, 36, 37, 57, 59 o 62.

15 20 25 30 35

30 Se divulan además variantes y fragmentos activos de polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-Ra. Dicho polinucleótido puede comprender el polinucleótido que codifica los polipéptidos expuestos en las SEQ ID NO: 26, 27, 36, 37, 57, 59 o 62 y continuar codificando proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-Ra funcionales.

35 Se reconoce además que los componentes de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra como se divulan en el presente documento pueden encontrarse en cualquier orden. En una realización, el polipéptido de IL-2 está en el extremo N y el dominio extracelular de IL-2Ra está en el extremo C de las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento.

#### *i. Interleucina-2*

40 45 50 55

La proteína de fusión de la invención comprende un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2); en donde el primer polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Como se usa en el presente documento, "Interleucina-2" o "IL-2" se refiere a cualquier IL-2 nativa o recombinante de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), y mamíferos domesticados o agrícolas, a menos que se indique otra cosa. El término abarca IL-2 sin procesar, así como, cualquier forma de IL-2 que sea resultado del procesamiento en la célula (es decir, la forma madura de IL-2). El término abarca también variantes y fragmentos de IL-2 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes aleáticas, y variantes que no son de origen natural. La secuencia de aminoácidos de una forma madura de ejemplo de IL-2 humana (que tiene la secuencia señal de 20 aminoácidos) se muestra en la SEQ ID NO: 2. La IL-2 humana sin procesar comprende además un péptido señal N-terminal de 20 aminoácidos (SEQ ID NO: 1), que está ausente en la molécula de IL-2 madura. La secuencia de aminoácidos de una forma madura de ejemplo de IL-2 de ratón (que tiene la secuencia señal de 20 aminoácidos) se muestra en la SEQ ID NO: 4. La IL-2 de ratón sin procesar comprende además un péptido señal N-terminal de 20 aminoácidos (SEQ ID NO: 3), que está ausente en la molécula de IL-2 madura. Véase también la FIG. 2A y la FIG. 2B. Por una "IL-2 nativa", también denominada "IL-2 de tipo silvestre", se entiende una IL-2 de origen natural o recombinante.

60 Se conocen secuencias adicionales de ácidos nucleicos y aminoácidos para IL-2. Véase, por ejemplo, los N.<sup>o</sup> de registro de GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (Mono nocturno de vientre gris)); Q7JFM5 (*Aotus nancymaae* (Mono nocturno de Ma)); P05016 (*Bos taurus* (Bovino)); Q29416 (*Canis familiaris* (Perro) (*Canis lupus familiaris*)); P36835 (*Capra hircus* (Cabra)); y, P37997 (*Equus caballus* (Caballo)).

65 En el presente documento también se divulan fragmentos y variantes biológicamente activos de IL-2. Dichas variantes o fragmentos activos de IL-2 conservarán la actividad IL-2. La expresión "actividad biológica de IL-2" se refiere a una o más de las actividades biológicas de IL-2, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de estimular linfocitos portadores del receptor de IL-2. Esta actividad puede medirse tanto *in vitro* como *in vivo*. La IL-2 es un regulador global de la actividad inmunitaria y los efectos observados en el presente documento son la suma de dichas actividades. Por

ejemplo, regula la actividad de supervivencia (Bc1-2), induce la actividad efectora T (IFN-gamma, Granzyma B y Perforina) y promueve la actividad reguladora T (FoxP3). Véase, por ejemplo, Malek *et al.* (2010) *Immunity* 33(2):153-65.

- 5 Se conocen variantes biológicamente activas de IL-2. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de solicitud de los EE. UU. 20060269515 y 20060160187 y el documento WO 99/60128.

En las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento pueden emplearse fragmentos y variantes biológicamente activos de IL-2. Un fragmento funcional de este tipo puede comprender al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

En el presente documento se divultan además variantes y fragmentos activos de polinucleótidos que codifican las proteínas de IL-2. Un polinucleótido funcional de este tipo puede comprender al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y continúa codificando un polipéptido de IL-2 funcional.

*ii. Receptor Alfa de Interleucina-2*

- 20 La proteína de fusión de la invención comprende un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular del receptor alfa de interleucina-2 (IL-2Ra), en donde el segundo polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; que tiene actividad biológica del dominio extracelular de IL-2Ra.

25 El término "CD25" o "receptor  $\alpha$  de IL-2" o "IL-2Ra", como se usa en el presente documento, se refieren a cualquier IL-2Ra nativo o recombinante de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas) y mamíferos domesticados o agrícolas, a menos que se indique otra cosa. El término también abarca las variantes de origen natural de IL-2Ra, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas, o variantes que no son de origen natural. La IL-2 humana ejerce sus efectos biológicos mediante la señalización a través de su sistema receptor, IL-2R. La IL-2 y su receptor (IL-2R) son necesarios para la proliferación de linfocitos T y otras funciones fundamentales que son cruciales para la respuesta inmunitaria. IL-2R consiste en 3 proteínas transmembrana de tipo I unidas de forma no covalente que son las cadenas alfa (p55), beta (p75) y gamma (p65). La cadena alfa del IL-2R humano contiene un dominio extracelular de 219 aminoácidos, un dominio transmembrana de 19 aminoácidos y un dominio intracelular de 13 aminoácidos. El dominio extracelular secretado de IL-2R alfa (IL-2R-a) puede emplearse en las proteínas de fusión que se describen en el presente documento.

35 La secuencia de aminoácidos de una forma madura de ejemplo de IL-2Ra humano se muestra en la SEQ ID NO: 6. El IL-2Ra humano sin procesar se muestra en la SEQ ID NO: 5. El dominio extracelular de la SEQ ID NO: 6 se expone en la SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de una forma madura de ejemplo de IL-2Ra de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 9. El IL-2Ra de ratón sin procesar se muestra en la SEQ ID NO: 8. El dominio extracelular de la SEQ ID NO: 9 se expone en la SEQ ID NO: 10. Por un "IL-2Ra nativo", también denominado "IL-2Ra de tipo silvestre", se entiende un IL-2Ra de origen natural o recombinante. La secuencia de una molécula de IL-2Ra humano nativo se muestra en las SEQ ID NO: 5 y 6. Se conocen las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos para IL-2Ra. Véase, por ejemplo, los N.º de registro de GenBank: NP\_001030597.1 (*P. troglodytes*); NP\_001028089.1 (*M. mulatta*); NM\_001003211.1 (*C. lupus*); NP\_776783.1 (*B. taurus*); NP\_032393.3 (*M. musculus*); y NP\_037295.1 (*R. norvegicus*).

40 En el presente documento también se divultan fragmentos y variantes biológicamente activos del dominio extracelular de IL-2Ra. Dichas variantes o fragmentos activos del dominio extracelular de IL-2Ra conservarán la actividad del dominio extracelular de IL-2Ra. La expresión "actividad biológica del dominio extracelular de IL-2Ra" se refiere a una o más de las actividades biológicas del dominio extracelular de IL-2Ra, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de potenciar la señalización intracelular en células que responden al receptor de IL-2. Se divulan ejemplos no limitantes de fragmentos y variantes biológicamente activos del IL-2Ra, por ejemplo, en Robb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5654-5658, 1988. En las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento pueden emplearse fragmentos y variantes biológicamente activos del dominio extracelular de IL-2Ra. Una variante funcional de este tipo puede comprender al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7.

45 En una realización, las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento pueden comprender al menos una mutación dentro del dominio extracelular de IL-2Ra. En una realización específica, la Arginina en la posición 35 de IL-2Ra puede mutarse a una Treonina y/o la Arginina en la posición 36 de IL-2Ra puede mutarse a una Serina. Una proteína de fusión de este tipo puede tener una actividad IL-2 aumentada en comparación con una proteína de fusión que no comprende estas mutaciones en el dominio extracelular de IL-2Ra y/o en comparación con IL-2 nativa o recombinante. Las secuencias de aminoácidos de proteínas de fusión de ejemplo que comprenden IL-2Ra con mutaciones dentro del dominio extracelular de IL-2Ra se exponen en las SEQ ID NO: 62 y 64. En una realización, la proteína de fusión de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 62; o una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % con la SEQ ID NO: 62.

En el presente documento se divultan además variantes y fragmentos activos de polinucleótidos que codifican el dominio extracelular de IL-2Ra. Un polinucleótido funcional de este tipo puede comprender al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y continúa codificando una proteína que tiene la actividad del dominio extracelular de IL-2Ra.

*iii. Componentes adicionales*

- 10 Las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento pueden comprender además elementos adicionales. Estos elementos pueden ayudar en la expresión de la proteína de fusión, ayudar en la secreción de la proteína de fusión, mejorar la estabilidad de la proteína de fusión, permitir una purificación más eficiente de la proteína y/o modular la actividad de la proteína de fusión.
- 15 "Heterólogo" en referencia a un polipéptido o polinucleótido es un polipéptido o polinucleótido que se origina a partir de una proteína o polinucleótido diferente. Los componentes adicionales de la proteína de fusión pueden originarse en el mismo organismo que los otros componentes polipeptídicos de la proteína de fusión, o los componentes adicionales pueden ser de un organismo diferente que los otros componentes polipeptídicos de la proteína de fusión.
- 20 En una realización, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento comprenden una secuencia enlazadora ubicada entre el polipéptido de IL-2 y el polipéptido de IL-2Ra. De acuerdo con la invención, el segundo polipéptido está fusionado en fase de lectura con el primer polipéptido mediante un enlazador, en donde la secuencia enlazadora comprende una combinación de restos de aminoácidos glicina y serina, es decir, la secuencia enlazadora es GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 13) (también indicada (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>).
- 25 Los enlazadores alternativos que pueden usarse pero que no se reivindican específicamente son un enlazador de cualquier longitud y que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50 o 60 o más aminoácidos; un enlazador que comprende restos de aminoácidos glicina; y los enlazadores de glicina/serina pueden comprender cualquier combinación de los restos de aminoácidos, incluyendo, el péptido GGGS o GGGGS o repeticiones de los mismos, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más repeticiones de estos péptidos dados. Por ejemplo, las secuencias enlazadoras pueden comprender GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 11) (también indicada (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>); o (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>5</sub>; (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>6</sub>; (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>7</sub>, etc. Las secuencias enlazadoras pueden comprender además (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> como se expone en la SEQ ID NO: 50; GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 40) (también indicada (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41) (también indicada (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>); (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>; (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub>; (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>6</sub>; (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>7</sub>; (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>8</sub>, etc. Además, pueden emplearse adicionalmente variantes y fragmentos activos de cualquier enlazador.
- 30 Se reconoce además que el polinucleótido que codifica las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra puede comprender elementos adicionales que ayudan en la traducción de la proteína de fusión. Dichas secuencias incluyen, por ejemplo, secuencias Kozak unidas al extremo 5' del polinucleótido que codifica la proteína de fusión. La secuencia consenso Kozak es una secuencia que se produce en el ARNm eucariota que desempeña una función en el inicio del proceso de traducción y tiene el consenso (gcc)gccRccAUGG (SEQ ID NO: 35); en donde (1) una letra minúscula indica la base más común en una posición en la que, no obstante, la base puede variar; (2) las letras mayúsculas indican bases altamente conservadas, es decir, la secuencia "AUGG" es constante o rara vez, o nunca, cambia, con la excepción del código de ambigüedad "R" de la IUPAC que indica que normalmente se observa una purina (adenina o guanina) en esta posición; y (3) la secuencia entre paréntesis ((gcc)) es de significado incierto. En una realización, la secuencia Kozak comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 53.
- 35 40 En una realización no limitante, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento comprenden una secuencia Kozak optimizada líder de IL-2 como se expone en la SEQ ID NO: 28 o una variante o fragmento funcional de la misma. Una variante o fragmento funcional de una secuencia Kozak conservará la capacidad de aumentar la traducción de la proteína en comparación con el nivel de traducción de una secuencia que carece del líder. Un fragmento funcional de este tipo puede comprender al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 nucleótidos continuos de una secuencia kozak o la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 28 o 53. Como alternativa, una variante funcional puede comprender al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia kozak o la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 28 o 53.
- 45 50 En una realización no limitante, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento comprenden una secuencia Kozak optimizada líder de IL-2 como se expone en la SEQ ID NO: 28 o una variante o fragmento funcional de la misma. Una variante o fragmento funcional de una secuencia Kozak conservará la capacidad de aumentar la traducción de la proteína en comparación con el nivel de traducción de una secuencia que carece del líder. Un fragmento funcional de este tipo puede comprender al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 nucleótidos continuos de una secuencia kozak o la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 28 o 53. Como alternativa, una variante funcional puede comprender al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia kozak o la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 28 o 53.
- 55 60 En otras realizaciones adicionales, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento comprenden uno o más marcadores en el extremo C para ayudar en la purificación del polipéptido. Dichos marcadores son conocidos e incluyen, por ejemplo, un marcador de Histidina. En realizaciones específicas se emplea un marcador 6X His. Se reconoce además que puede emplearse una secuencia enlazadora adicional entre la proteína de fusión y el marcador His.
- 65 En la FIG. 1 se expone una realización no limitante de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra. Una proteína de fusión de

este tipo comprende un péptido líder, IL-2 o una variante o fragmento funcional de la misma, un enlazador variable, IL2Ra, un enlazador de glicina, marcador 6x his y dos codones de terminación.

iv. Variantes y fragmentos

5

a. Polinucleótidos

En los diversos métodos y composiciones divulgados en el presente documento pueden emplearse fragmentos y variantes de los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión IL-2/dominio extracelular de IL-2Ra o los diversos componentes que contienen (es decir, el dominio extracelular de IL-2Ra, los polipéptidos de IL-2Ra, las secuencias enlazadoras y/o las secuencias Kozak). Por "fragmento" se entiende una porción del polinucleótido y, por lo tanto, la proteína codificada mediante el mismo, o una porción del polipéptido. Los fragmentos de un polinucleótido pueden codificar fragmentos de proteína que conservan la actividad biológica de la proteína nativa y, por lo tanto, tienen actividad IL-2, actividad del dominio extracelular de IL-2Ra, actividad de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra, o si codifican una secuencia enlazadora, proporcionan la actividad deseada de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra.

Una porción biológicamente activa de un dominio extracelular de IL-2Ra, polipéptido de IL-2, proteína de fusión IL-2/IL-2Ra, secuencia de Kozak o secuencia enlazadora, puede prepararse aislando una porción de uno de los polinucleótidos que codifican la porción del dominio extracelular de IL-2Ra o el polipéptido de IL-2 y expresando la porción codificada del polipéptido (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*), y evaluando la actividad de la porción del dominio extracelular de IL-2Ra o/y del polipéptido de IL-2 o la actividad de las proteínas de fusión IL-2/IL-Ra.

Las secuencias "variantes" tienen un alto grado de similitud de secuencia. Para los polinucleótidos, las variantes conservadoras incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos del dominio extracelular de IL-2Ra, polipéptidos de IL-2, proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra o secuencias enlazadoras. Pueden identificarse variantes tales como estas con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Los polinucleótidos variantes incluyen también secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, pero que aún codifican un dominio extracelular de IL-2Ra, polipéptido de IL-2, proteína de fusión IL-2/IL-2Ra, una secuencia Kozak o la secuencia enlazadora.

b. Polipéptidos

35

Por proteína "variante" se entiende una proteína derivada de la proteína nativa por supresión (denominada truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al extremo N y/o al extremo C de la proteína nativa; la supresión o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa; o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Las proteínas variantes son biológicamente activas, es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada, es decir, la actividad de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra, la actividad IL-2 o actividad del dominio extracelular de IL-2Ra. Dichas variantes pueden ser el resultado de, por ejemplo, el polimorfismo genético o de la manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra o uno cualquiera de sus componentes (es decir, un polipéptido del dominio extracelular de IL-2Ra, un polipéptido de IL-2 o una secuencia enlazadora) tendrá al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa determinada por los programas de alineación de secuencias y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Una variante biológicamente activa de una proteína puede diferir de esta proteína en tan sólo 1-15 restos de aminoácidos, tan sólo 1-10, tal como 6-10, tan sólo 5, tan sólo 4, 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido.

50

Las proteínas pueden alterarse de diversas maneras incluyendo sustituciones, supresiones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de IL-2Ra, polipéptido de IL-2, proteína de fusión IL-2/IL-2Ra o secuencias enlazadoras mediante mutaciones en el ADN. Son bien conocidos en la técnica los métodos para las mutagénesis y alteraciones en las secuencias de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; la Patente de los EE. UU. N.º 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias citadas en los mismos. En el modelo de Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (*Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, D.C.) pueden encontrarse directrices sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés. Pueden ser preferibles sustituciones conservadoras, tales como intercambiar un aminoácido por otro que tenga propiedades similares.

Por lo tanto, los polinucleótidos divulgados en el presente documento pueden incluir las secuencias de origen natural, las secuencias "nativas", así como las formas mutantes. Análogamente, las proteínas utilizadas en los métodos divulgados en el presente documento abarcan proteínas de origen natural, así como variaciones y formas modificadas

de las mismas. Dichas variantes continuarán poseyendo la capacidad de implementar un episodio de recombinación. En general, las mutaciones realizadas en el polinucleótido que codifica el polipéptido variante no deberían colocar la secuencia fuera del marco de lectura, y/o crear regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria del ARNm. Véase, la Publicación de solicitud de patente N.º EP 75.444.

- 5 Los polinucleótidos y proteínas variantes abarcan también secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y recombinogénico tal como la transposición del ADN. Con un procedimiento de este tipo, pueden manipularse una o más secuencias codificantes del dominio extracelular de IL-2Ra o de IL-2 diferentes para crear un nuevo dominio extracelular de IL-2Ra o polipéptidos de IL-2 que posean las propiedades deseadas. De esta manera,
- 10 se generan bibliotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de secuencias relacionadas que comprenden regiones de secuencias que tienen una identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse homólogamente *in vitro* o *in vivo*. Se conocen en la técnica estrategias para dicha transposición de ADN. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Crameri et al. (1998) *Nature* 391:288-291; y Patentes de los EE. UU. N.º 5.605.793 y 5.837.458.

### III. Polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra y métodos de producción

- 20 Las composiciones divulgadas en el presente documento incluyen además polinucleótidos aislados que codifican las diversas proteínas de fusión descritas anteriormente en el presente documento, y variantes y fragmentos de los mismos. Se divultan además vectores y cassetes de expresión que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento. Los cassetes de expresión generalmente incluirán un promotor unido operativamente a un polinucleótido y una región de terminación transcripcional y traduccional.
- 25 No se pretende que el uso del término "polinucleótido" limite la presente invención a polinucleótidos que comprenden ADN. Los expertos habituales en la materia reconocerán que los polinucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Dichos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen moléculas tanto de origen natural como análogos sintéticos.
- 30 Un polinucleótido o proteína "aislados" o "purificados", o una parte biológicamente activa de los mismos, está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el polinucleótido o proteína que se encuentran en su entorno natural. Por lo tanto, un polinucleótido o una proteína aislados o purificados están sustancialmente libres de otro material celular o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. De manera óptima, un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias (óptimamente secuencias codificantes de proteínas) que flanquean de forma natural al polinucleótido (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del que deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb,
- 35 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia de nucleótidos que flanquean de forma natural el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente un 30%, 20 %, 10 %, 5% o 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la invención o la porción biológicamente activa de la misma se producen de forma recombinante, el medio de cultivo óptimo representa menos de aproximadamente un 30%, 20 %, 10 %, 5% o 1% (en peso seco) de precursores químicos o sustancias químicas distintas de proteínas de interés.
- 40

En el presente documento pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

- 55 En el presente documento también se divulga un vector que comprende los polinucleótidos descritos anteriormente unidos operativamente a un promotor. Una secuencia de nucleótidos está "unida operativamente" a una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, un promotor) cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia. La expresión "unido operativamente" cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos incluye tener una señal de inicio apropiada (por ejemplo, ATG) delante de la secuencia de nucleótidos que ha de expresarse y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia bajo el control de la secuencia de control de la expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia. Si un gen que se desea insertar en una molécula de ácido nucleico recombinante no contiene una señal de inicio apropiada, puede insertarse una señal de inicio de este tipo delante del gen. Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación del segmento unido. El promotor puede ser, o es idéntico a, un promoter bacteriano, de levadura, de insecto o de mamífero. Además, el

vector puede ser un plásmido, cósmido, cromosoma artificial de levadura (YAC), ADN vírico, de bacteriófago o eucariótico.

5 Pueden emplearse otras numerosas cadenas principales de vectores conocidas en la técnica como útiles para expresar proteínas. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación: adenovirus, virus de simio 40 (SV40), citomegalovirus (CMV), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus de la leucemia murina de Moloney, sistemas de suministro de ADN, es decir, liposomas y sistemas de suministro de plásmidos de expresión. Además, una clase de vectores comprende elementos de ADN derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino, virus del polioma, baculovirus, retrovirus o virus del bosque de Semliki. Dichos vectores pueden obtenerse en el mercado o ensamblarse 10 a partir de las secuencias descritas mediante métodos bien conocidos en la técnica.

En el presente documento se divulga un sistema de vector hospedador para la producción de un polipéptido que comprende el vector de una célula hospedadora adecuada. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, pero sin limitación, células procariotas o eucariotas, por ejemplo, células bacterianas (incluyendo las células grampositivas), 15 células de levadura, células fúngicas, células de insectos y células de animales. Pueden usarse numerosas células de mamíferos como hospedadores, incluyendo, pero sin limitación, la célula de fibroblasto de ratón NIH 3T3, linfocitos CHO, células HeLa, células Ltk<sup>-</sup>, etc. También pueden usarse otras células de animales, tales como las células R1.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insecto (por ejemplo, Sf9) y células humanas y vegetales en cultivo de tejidos.

20 Puede emplearse una amplia diversidad de combinaciones de hospedador/vector de expresión para expresar las secuencias de polinucleótidos presentadas en el presente documento. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, Plásmidos de *E. coli* col EI, 25 pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; DNAs de fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago λ, por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentoso; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2μ o derivados del mismo; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insectos o de mamíferos; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras 30 secuencias de control de la expresión; y similares.

En estos vectores puede usarse cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión (secuencias que controlan la expresión de una secuencia de nucleótidos unidas operativamente a ella) para expresar las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el sistema LTR, las principales regiones operadoras y promotoras del fago λ, las regiones de control de la proteína de recubrimiento de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, PhoS), los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura y otras secuencias conocidas para controlar la expresión 40 de genes de células procariotas o eucariotas o de sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

Se entenderá que no todos los vectores, las secuencias de control de la expresión y los hospedadores funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento. Tampoco todos los hospedadores funcionarán igual de bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la 45 materia podrá seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión y los hospedadores adecuados sin experimentación indebida para lograr la expresión deseada sin salirse del ámbito de la presente invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, se debe tener en cuenta el hospedador porque el vector debe funcionar en él. También se tendrá en cuenta el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores antibióticos. A la hora de 50 seleccionar una secuencia de control de la expresión, normalmente se tendrá en cuenta una diversidad de factores.

Éstos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su controlabilidad y su compatibilidad con la secuencia de nucleótidos o gen particular que ha de expresarse, en particular en lo que respecta a las posibles estructuras secundarias. Los hospedadores unicelulares adecuados se seleccionarán teniendo en cuenta, por ejemplo, su 55 compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar proteínas correctamente y sus requisitos de fermentación, así como la toxicidad para el hospedador del producto codificado por las secuencias de nucleótidos que se han de expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

En la preparación del casete de expresión, los diversos polinucleótidos pueden manipularse, para que proporcionen 60 las secuencias de polinucleótidos en la orientación adecuada y, según sea apropiado, en la fase de lectura adecuada. Para este fin, pueden emplearse adaptadores o enlazadores para unir los polinucleótidos o pueden realizarse otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminación de ADN superfluo, eliminación de sitios de restricción, o similares. Por ejemplo, pueden añadirse enlazadores tales como dos glicinas entre polipéptidos. Pueden añadirse restos de metionina codificados por secuencias de nucleótidos atg para permitir el inicio de la 65 transcripción génica. Para ello, se puede recurrir a la mutagénesis *in vitro*, la reparación de cebadores, la restricción, la hibridación, las resustituciones, por ejemplo, las transiciones y las transversiones.

Se proporciona además un método de producción de un polipéptido que comprende expresar un polinucleótido que codifica una proteína de fusión divulgada en el presente documento en una célula hospedadora en condiciones adecuadas que permitan la producción del polipéptido y la recuperación del polipéptido producido de este modo; en donde el polipéptido es la proteína de fusión de acuerdo con la invención.

5 IV. Proteína de fusión IL-2/IL-2Ra para su uso en métodos

10 Se divultan diversos métodos para modular una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, el término "modular" incluye inducir, inhibir, potenciar, elevar, aumentar o disminuir una actividad o respuesta dada.

15 Por "sujeto" se entiende mamíferos, por ejemplo, primates, seres humanos, animales agrícolas y domesticados tales como, pero sin limitación, perros, gatos, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, y similares. En una realización, el sujeto que se somete a tratamiento con las formulaciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento es un ser humano.

20 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra se refiere a la cantidad de proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra suficientes para provocar una respuesta biológica deseada. Como apreciará un experto habitual en la materia, la cantidad absoluta de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra particular que es eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra que han de suministrarse, la célula o tejido diana, y similares. Un experto habitual en la materia comprenderá además que puede administrarse una cantidad eficaz en una dosis única o puede lograrse mediante la administración de dosis múltiples (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis).

25 i. *Proteína de fusión para su uso en un método para aumentar una respuesta inmunitaria*

30 Se divultan diversos métodos para aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto. Dichos métodos comprenden administrar a un sujeto que necesita un aumento en la respuesta inmunitaria una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra. Por ello, en realizaciones específicas, se emplea la aplicación transitoria de dosis más altas de IL-2 para estimular las respuestas efectoras inmunitarias y de memoria.

35 Se reconoce además que las diversas proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra pueden usarse en combinación con un antígeno para potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno. Por lo tanto, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra también pueden usarse como adyuvante de vacunas, especialmente para estimular la memoria inmunitaria mediada por células.

40 Por ejemplo, la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra de acuerdo con la invención puede usarse para potenciar una preparación de vacuna. Por lo tanto, las diversas proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra son útiles para aumentar la eficacia de las vacunas contra el cáncer o para vacunas poco inmunogénicas. Además, la proteína de fusión de la invención puede usarse en un método de potenciación de la eficacia o inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto, o superación de una respuesta inmunitaria suprimida a una vacuna en un sujeto, que incluye (i) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra y (ii) administrar al sujeto una vacuna.

45 Por "vacuna" se entiende una composición útil para estimular una respuesta inmunitaria específica (o respuesta inmunogénica) en un sujeto. En algunas realizaciones, la respuesta inmunogénica es protectora o proporciona inmunidad protectora. Por ejemplo, en el caso de un organismo causante de enfermedad, la vacuna permite al sujeto resistir mejor la infección o la progresión de la enfermedad del organismo contra el que se dirige la vacuna. Como alternativa, en caso de un cáncer, la vacuna fortalece las defensas naturales del sujeto contra los cánceres que ya se han desarrollado. Estos tipos de vacunas también pueden prevenir el crecimiento adicional de los cánceres existentes, prevenir la reaparición de cánceres tratados y/o eliminar las células cancerosas que no fueron destruidas por tratamientos anteriores.

55 Las vacunas representativas incluyen, pero sin limitación, vacunas contra difteria, tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas, rubéola, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* de tipo b, varicela, meningitis, virus de la inmunodeficiencia humana, tuberculosis, virus de Epstein Barr, paludismo, hepatitis E, el dengue, rotavirus, herpes, virus del papiloma humano y cánceres. Las vacunas de interés incluyen las dos vacunas autorizadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. para prevenir infecciones víricas que pueden conducir a cáncer: la vacuna contra la hepatitis B, que previene la infección por el virus de la hepatitis B, un agente infeccioso asociado al cáncer de hígado (*MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46:107-09, 1997); y Gardasil™, que previene la infección con los dos tipos de virus del papiloma humano que juntos causan el 70 por ciento de los casos de cáncer de cuello uterino en todo el mundo (Speck y Tyring, *Skin Therapy Lett.* 11:1-3, 2006). Otras vacunas de tratamiento de interés incluyen vacunas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, cáncer de cuello uterino, linfoma no Hodgkin folicular de linfocitos B, cáncer de riñón, melanoma cutáneo, melanoma ocular, cáncer de próstata y mieloma múltiple. Al "potenciar la eficacia" o "potenciar la inmunogenicidad" con respecto a una vacuna se pretende mejorar un resultado, por ejemplo, medido por un cambio de un valor específico, tal como un aumento o una disminución en un parámetro particular de una actividad de una vacuna asociada a inmunidad protectora. En una realización, la potenciación se refiere a al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de aumento en un parámetro particular. En otra realización, la

- potenciación se refiere a al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de disminución en un parámetro particular. En un ejemplo, la potenciación de la eficacia/inmunogenicidad de una vacuna se refiere a un aumento en la capacidad de la vacuna para inhibir o tratar la progresión de la enfermedad, tal como al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de aumento en la eficacia de la vacuna para ese fin. En un ejemplo adicional, la potenciación de la eficacia/inmunogenicidad de una vacuna se refiere a un aumento en la capacidad de la vacuna para reclutar las defensas naturales del sujeto contra los cánceres que ya se han desarrollado, tal como al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de aumento en la eficacia de la vacuna para ese fin.
- 5 De manera similar, por "superar una respuesta inmunitaria suprimida" con respecto a una vacuna se pretende mejorar un resultado, por ejemplo, medido por un cambio de un valor específico, tal como un retorno a un valor anteriormente positivo en un parámetro particular de una actividad de una vacuna asociada a inmunidad protectora. En una realización, la superación se refiere al menos a un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de aumento en un parámetro particular. En un ejemplo, superar una respuesta inmunitaria suprimida a una vacuna se refiere a una capacidad renovada de la vacuna para inhibir o tratar la progresión de la enfermedad, tal como al menos un 5 %, 10 %,
- 10 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de renovación en la eficacia de la vacuna para ese fin. En un ejemplo adicional, superar una respuesta inmunitaria suprimida a una vacuna se refiere a una capacidad renovada de la vacuna para reclutar las defensas naturales del sujeto contra los cánceres que ya se han desarrollado, tal como al menos un 25 %, 50 %, 100 % o más de un 100 % de renovación en la eficacia de la vacuna para ese fin. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que es útil en el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  es una cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para conseguir un efecto deseado, tales como modular una respuesta inmunitaria en un sujeto sin provocar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. Como se ha esbozado anteriormente, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  a un sujeto para aumentar una respuesta inmunitaria, potenciar la respuesta inmunitaria a un antígeno, potenciar la eficacia o inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto, o superar una respuesta inmunitaria suprimida a una vacuna. La cantidad eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  útil para modular dichas funciones dependerá del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección y la forma de administración de las proteínas de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$ . Las dosis de ejemplo incluyen de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^7$  UI de actividad IL-2 por adulto, de aproximadamente  $10^4$  a  $10^5$  UI de actividad IL-2 por adulto, de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto, de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^7$  UI de actividad IL-2 por adulto. En otros casos, la dosis terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  es de aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  100 veces, es de aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  10 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  2 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  20 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  30 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  40 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  50 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  60 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  70 veces, aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  80 veces o aproximadamente  $10^5$  UI de actividad IL-2  $\pm$  90 veces. En una realización no limitante específica, a esta dosis se administra una proteína de fusión de IL-2 humana.
- 15 En una realización, el patrón de referencia para la proteína de fusión de IL-2 de ratón es la IL-2 de ratón de eBiosciences (Número de catálogo: 14-8021). Brevemente, la bioactividad de la IL-2 de ratón de eBioscience es la siguiente: La DE50 de esta proteína, medida mediante el ensayo de proliferación celular de CTLL-2, es inferior o igual a 175 pg/ml. Esto corresponde a una actividad específica superior o igual a  $5,7 \times 10^6$  Unidades/mg.
- 20 En otra realización, el patrón de referencia para la proteína de fusión de IL-2 humana es el fármaco de IL-2 humana Aldesleucina (Proleukin). Por lo tanto, las proteínas de fusión de IL-2 divulgadas en el presente documento se comparan directamente con la proteína de fusión del fármaco de IL-2 que se usa en terapia con IL-2 a dosis baja o alta. La actividad IL-2 para IL-2 de ratón y humana usa el mismo ensayo y su actividad en unidades/mg es similar. Con respecto al fármaco de IL-2 humana, es decir, aldesleucina (Proleukin), la medida de referencia de una cantidad de IL-2 es la Unidad Internacional (UI) que técnicamente no es una cantidad fija sino la cantidad que produce un efecto fijo en un ensayo específico de actividad biológica, es decir, un ensayo de proliferación de CTLL. En la práctica, la fabricación de IL-2 está normalizada y existe una conversión entre el peso del fármaco y las Unidades Internacionales. Son 1,1 mg de IL-2 = 18 millones de UI (abreviado 18 MUI).
- 25 Se entiende además que las dosis apropiadas de un agente funcional dependen de la potencia del agente activo con respecto a la actividad que ha de modularse. Dichas dosis apropiadas pueden determinarse usando los ensayos descritos en el presente documento. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del sujeto, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y/o cualquier combinación de fármacos.
- 30 Cuando la administración sea con fines de tratamiento, la administración puede tener fines profilácticos o terapéuticos. Cuando se proporciona de manera profiláctica, la sustancia se proporcione con antelación a cualquier síntoma. La administración profiláctica de la sustancia sirve para prevenir o atenuar cualquier síntoma posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la sustancia se proporciona al inicio de un síntoma (o poco después). La administración terapéutica de la sustancia sirve para atenuar cualquier síntoma real.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación necesaria para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Asimismo, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosificación eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra utilizada para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del curso de un tratamiento particular. Pueden producirse cambios en la dosificación y hacerse evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describen en el presente documento.
- Las cantidades terapéuticamente eficaces de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra pueden determinarse mediante estudios en animales. Cuando se usan ensayos con animales, se administra una dosificación para proporcionar una concentración *in vivo* diana similar a la que ha demostrado ser eficaz en los ensayos con animales.
- ii. Proteína de fusión para su uso en un método para disminuir una respuesta inmunitaria*
- La invención incluye además una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención para su uso en la disminución de la respuesta inmunitaria en un sujeto. Se divulgan diversos métodos para disminuir la respuesta inmunitaria en un sujeto. Dichos métodos comprenden administrar a un sujeto que necesita una disminución en la respuesta inmunitaria una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra.
- Existe mucho interés en aprovechar el poder supresor de los Treg para inhibir respuestas inmunitarias no deseadas. Los datos en ratones y ser humano muestran que potenciar la señalización de IL-2R con una dosis baja de IL-2 estimula selectivamente los Treg y potencia los mecanismos inmunitarios tolerogénicos. Las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra divulgadas en el presente documento representan una forma nueva y mejorada de IL-2 que potencialmente potencia más los Treg. Por lo tanto, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra pueden administrarse a pacientes con enfermedades autoinmunitarias, enfermedad crónica de injerto contra hospedador, reacciones de rechazo de trasplantes y otras afecciones en las que el objetivo es suprimir la autorreactividad.
- Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra que promueve la tolerancia inmunitaria puede encontrar uso, por ejemplo, en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno autoinmunitario o inflamatorio, incluyendo, pero sin limitación, rechazos de injertos y alergias. Por lo tanto, en una realización, se proporciona una proteína de fusión de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno autoinmunitario o inflamatorio. Dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra.
- Los ejemplos no limitantes de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse o prevenirse incluyen diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis sistémica, enfermedad de injerto contra hospedador, vasculitis inducida por el VHC, alopecia areata o psoriasis.
- Otras enfermedades autoinmunitarias incluyen aquellas en las que ya hay indicios de que los Treg pueden estar alterados y se beneficiarán de la estimulación de los Treg dependiente de IL-2. A este respecto, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en IL-2, IL-2Ra o IL-2R13 se han asociado como un riesgo genético para diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis sistémica. Los estudios sugieren que el riesgo genético está relacionado con un número y/o actividad alterados de Treg. Además, se ha demostrado que la terapia con IL-2 a dosis bajas beneficia a los pacientes con EICH crónica y vasculitis inducida por el VHC. Por lo tanto, a dichas poblaciones de pacientes también se les puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra.
- En otras realizaciones, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra como se divultan pueden usarse en combinación con un agente terapéutico para reducir la respuesta inmunitaria al agente (es decir, proteína). Por ejemplo, las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra como se divultan pueden usarse en combinación con una proteína terapéutica que debe administrarse crónicamente a un sujeto. Por lo tanto, en una realización específica, el método incluye administrar al sujeto al menos un agente terapéutico adicional en combinación con una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra. Dichos agentes terapéuticos, incluyen, pero sin limitación, una citocina, un glucocorticoide, una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina o epirrubicina), una fluoroquinolona (por ejemplo, ciprofloxacino), un antifolato (por ejemplo, metotrexato), un antimetabolito (por ejemplo, fluorouracilo), un inhibidor de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina, irinotecán o etopósido), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, mitolactol o melfalán), un antiandrógeno (por ejemplo, flutamida), un antiestrógeno (por ejemplo, tamoxifeno), un compuesto de platino (por ejemplo, cisplatino), un alcaloide de la vinca (por ejemplo, vinorelbina, vinblastina o vindesina) o un inhibidor mitótico (por ejemplo, paclitaxel o docetaxel).
- Asimismo, la cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra como se divultan puede administrarse además en terapias de combinación para aumentar los Treg y la tolerancia. Dichas terapias de combinación pueden comprender la cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra en

combinación con anti-TNF $\alpha$  u otros agentes para inhibir las respuestas inflamatorias. La cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  útil para disminuir una respuesta inmunitaria dependerá del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección y la forma de administración de las proteínas de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$ . Las dosis de ejemplo incluyen de aproximadamente  $10^3$  UI a aproximadamente  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto o de aproximadamente  $10^4$  UI a aproximadamente  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto. Las dosis de ejemplo incluyen de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto, de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto, de aproximadamente  $10^4$  a  $10^5$  UI de actividad IL-2 por adulto, o de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto. En otros casos, la dosis terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  es de aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  100 veces, es de aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  10 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  2 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  20 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  30 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  40 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  50 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  60 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  70 veces, aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  80 veces o aproximadamente  $10^4$  UI de actividad IL-2  $\pm$  90 veces. En una realización no limitante específica, a esta dosis se administra una proteína de fusión de IL-2 humana.

En una realización, el patrón de referencia para la proteína de fusión de IL-2 de ratón es la IL-2 de ratón de eBiosciences (Número de catálogo: 14-8021). Brevemente, la bioactividad de la IL-2 de ratón de eBioscience es la siguiente: La DE50 de esta proteína, medida mediante el ensayo de proliferación celular de CTLL-2, es inferior o igual a 175 pg/ml. Esto corresponde a una actividad específica superior o igual a  $5,7 \times 10^6$  Unidades/mg.

En otra realización, el patrón de referencia para la proteína de fusión de IL-2 humana es el fármaco de IL-2 humana Aldesleucina (Proleukin). Por lo tanto, las proteínas de fusión de IL-2 divulgadas en el presente documento se comparan directamente con la proteína de fusión del fármaco de IL-2 que se usa en terapia con IL-2 a dosis baja o alta. La actividad IL-2 para IL-2 de ratón y humana usa el mismo ensayo y su actividad en unidades/mg es similar. Con respecto al fármaco de IL-2 humana, es decir, aldesleucina (Proleukin), la medida de referencia de una cantidad de IL-2 es la Unidad Internacional (UI) que técnicamente no es una cantidad fija sino la cantidad que produce un efecto fijo en un ensayo específico de actividad biológica, es decir, un ensayo de proliferación de CTLL. En la práctica, la fabricación de IL-2 está normalizada y existe una conversión entre el peso del fármaco y las Unidades Internacionales. Son 1,1 mg de IL-2 = 18 millones de UI (abreviado 18 MUI).

Se entiende además que las dosis apropiadas de un agente funcional dependen de la potencia del agente activo con respecto a la expresión o actividad que ha de modularse. Dichas dosis apropiadas pueden determinarse usando los ensayos descritos en el presente documento. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del sujeto, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y/o cualquier combinación de fármacos.

Cuando la administración sea con fines de tratamiento, la administración puede tener fines profilácticos o terapéuticos. Cuando se proporciona de manera profiláctica, la sustancia se proporcione con antelación a cualquier síntoma. La administración profiláctica de la sustancia sirve para prevenir o atenuar cualquier síntoma posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la sustancia se proporciona al inicio de un síntoma (o poco después). La administración terapéutica de la sustancia sirve para atenuar cualquier síntoma real.

El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación necesaria para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Asimismo, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosificación eficaz de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  utilizada para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del curso de un tratamiento particular. Pueden producirse cambios en la dosificación y hacerse evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describen en el presente documento.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de una proteína de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  pueden determinarse mediante estudios en animales. Cuando se usan ensayos con animales, se administra una dosificación para proporcionar una concentración tisular diana similar a la que ha demostrado ser eficaz en los ensayos con animales.

*iii. Composición farmacéutica*

Las diversas proteínas de fusión IL-2/IL-2R $\alpha$  divulgadas en el presente documento (también denominadas en el presente documento "compuestos activos") pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones normalmente comprenden la proteína de fusión y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la

administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

- 5 Una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica) y transmucosa. Además, puede ser deseable administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica localmente en una zona que necesite tratamiento. Esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, infusión o perfusión local o regional durante la cirugía, aplicación tópica, inyección, catéter, suppositorio o implante (por ejemplo, implantes formados por materiales porosos, no porosos o gelatinosos, incluyendo membranas, tales como membranas o fibras sialásticas), y similares. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica se suministra en una vesícula, tal como liposomas (véase, por ejemplo, Langer, *Science* 249:1527-33, 1990 y Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein y Fidler (eds.), Liss, N.Y., págs. 35365, 1989).
- 10 En otra realización más, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En un ejemplo, puede usarse una bomba (véase, por ejemplo, Langer, *Science* 249:1527-33, 1990; Sefton, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-40, 1987; Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507-16, 1980; Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574-79, 1989). En otro ejemplo, pueden usarse materiales poliméricos (véase, por ejemplo, Levy *et al.*, *Science* 228:190-92, 1985; During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351-56, 1989; Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105-12, 1989). También pueden usarse otros sistemas de liberación controlada, tales como los analizados por Langer (*Science* 249:1527-33, 1990).
- 15 25 Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.
- 20 35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL® (BASF; Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 30 40 45 50 55 60 65 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, lo que proporciona un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por filtración de los mismos.
- Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono o un nebulizador.
- La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se ha de permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la materia, e incluyen, por ejemplo, para la administración

transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulaan en pomadas, bálsamos, geles o cremas, como se conoce generalmente en la materia. Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases para supositorios convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

5 Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protejan al compuesto de una rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo,

10 polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos). Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos

15 por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE. UU. N.º 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma farmacéutica unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se ha de tratar conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La especificación para las formas farmacéuticas de la presente invención viene dictada por las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que ha de conseguirse, y depende directamente de ellas, así como de las limitaciones inherentes a la técnica de formación de compuestos de dicho compuesto funcional para el tratamiento de individuos.

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

#### *iv. Kits*

30 Como se usa en el presente documento, un "kit" comprende una proteína de fusión IL-2/IL-2Ra para su uso en la modulación de la respuesta inmunitaria, como se describe en otra parte del presente documento. Los términos "kit" y "sistema", como se usan en el presente documento, pretenden referirse a al menos una o más proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra que, en realizaciones específicas, están en combinación con uno o más tipos diferentes de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, recipientes, envases, tales como acondicionamientos destinados a la venta comercial, instrucciones de uso, etc.).

#### V. Identidad de secuencia

40 Como se ha descrito anteriormente, se divultan variantes y fragmentos activas de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra o el polinucleótido que codifica las mismas, incluyendo los diversos componentes de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra. Dichos componentes incluyen, IL-2, el dominio extracelular de IL-2Ra, las secuencias enlazadoras o la secuencia de Kozak. La actividad conservada por la variante o el fragmento activos de la proteína de fusión o un componente dado de la proteína de fusión se analiza con mayor detalle en otra parte del presente documento.

45 Tales variantes pueden tener al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido o polinucleótido de referencia dado. Un fragmento puede comprender al menos 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos de referencia dada o hasta la longitud total de una secuencia de referencia de nucleótidos dada; o un fragmento puede comprender al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 aminoácidos contiguos o hasta la longitud completa de una secuencia polipeptídica de referencia dada.

55 Como se usa en el presente documento, la "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas hacen referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación específica. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas normalmente difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras, donde se sustituyen los restos de aminoácido por otros restos de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar por exceso para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se asigna a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se asigna a una sustitución no conservadora una puntuación de cero, se asigna a una sustitución conservadora una puntuación entre cero y 1. La puntuación de

sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo, como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

- 5 Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se encuentran la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.
- 10 A menos que se indique otra cosa, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en el presente documento se refieren al valor obtenido usando GAP Versión 10 usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando una ponderación de GAP de 50 y una ponderación de la longitud de 3 y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos usando una ponderación de GAP de 8 y una ponderación de la longitud de 2 y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente de los mismos. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera una alineación que tiene emparejamientos de restos de nucleótidos o aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico en comparación con la alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.
- 15 Como se usa en el presente documento, los términos en singular "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.
- 20 25 30 La materia objeto de la presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### **Parte experimental**

- 35 IL-2 es un producto biológico que se ha utilizado en intentos de estimular las respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer y VIH/SIDA. Más recientemente, se han utilizado dosis mucho más bajas de IL-2 para estimular selectivamente la tolerancia y suprimir respuestas inmunitarias no deseadas asociadas a ataques de tipo autoinmunitario a los propios tejidos. De manera importante, estas dosis bajas de IL-2 no han mostrado signos de potenciación o reactivación de los linfocitos T autorreactivos. Sin embargo, la IL-2 tiene importantes inconvenientes como agente terapéutico, incluyendo una semivida muy corta *in vivo*, lo que limita su eficacia, y toxicidad a dosis elevadas. Por estas razones, 40 se ha producido un nuevo producto biológico de IL-2 con el objetivo de mejorar su farmacocinética y la durabilidad de las respuestas para su uso 1) en terapias basadas en IL-2 a dosis bajas para estimular los linfocitos T reguladores (Treg) y la tolerancia inmunitaria y 2) en terapia adyuvante con dosis más altas para estimular las respuestas inmunitarias y la memoria. Para lograr estos objetivos, se han desarrollado proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra, donde 45 estas fusiones se diseñaron para aumentar la disponibilidad de IL-2 mediante el aumento de la estimulación persistente por IL-2 de los linfocitos portadores de IL-2R *in vivo*. Estas fusiones consisten en proteínas modificadas por ingeniería genética de la siguiente manera (FIG. 1): 1) una secuencia líder de IL-2 que contiene una secuencia Kozak optimizada para una traducción eficaz; 2) la secuencia de longitud completa de IL-2; 3) una secuencia enlazadora de glicina o glicina/serina de longitud variable; 4) la secuencia codificante del dominio extracelular expresado de IL-2Ra; 5) un espaciador de glicina de 2 aminoácidos; 6) una región de polihistidina de seis aminoácidos para la purificación; y 7) dos codones de terminación. Las secuencias de proteínas predichas de estos ADNc de ratón y ser humano se muestran para las proteínas de fusión IL-2/(GlySer)/IL-2Ra en la FIG. 2A y FIG. 2B, respectivamente. Estos ADNc se clonaron en el vector de expresión pC1neo y se usaron para la expresión de estas proteínas de fusión en células COS7. El análisis de los sobrenadantes del cultivo indicó que cada proteína de fusión de ratón presentó bioactividad IL-2 *in vitro*, con actividad óptima asociada a la proteína de fusión IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra (FIG. 3A). En consecuencia, la 50 inclusión de anti-IL-2 en este bioensayo inhibió totalmente la proliferación (FIG. 3B). Se prepararon cantidades mayores de IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra e IL-2/(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>/IL-2Ra después de la expresión en células CHO y se purificaron mediante cromatografía de afinidad mediante la unión del marcador His 6x de la proteína de fusión a níquel inmovilizado. La proteína de fusión de ratón IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra mostró una mayor bioactividad IL-2 que IL-2/(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>/IL-2Ra (FIG. 4A) aunque ambas proteínas de fusión inhibieron de manera similar la unión de dos anticuerpos anti-IL-2Ra (PC61 y 55 60 65 7D4) (FIG. 4B) a células que expresaban IL-2Ra, confirmando que una mayor actividad IL-2 se asocia a la proteína de fusión anterior. La inhibición de la unión de PC61 y 7D4 también indica que la porción IL-2Ra de la proteína de fusión conservó suficiente estructura terciaria para unirse a estos anticuerpos. Sin embargo, estas proteínas de fusión no inhibieron la unión de un anticuerpo monoclonal (3C7) dirigido al sitio de unión a IL-2 de IL-2Ra, a células que expresaban IL-2Ra. Este resultado implica que la IL-2 dentro de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra está espacialmente cerca del sitio de unión de IL-2Ra (FIG. 5). El análisis por transferencia Western de estas proteínas de fusión mostró que IL-2/IL-2Ra tenía 55-65 kDa, con movilidad algo más rápida en condiciones no reductoras, y que era

aproximadamente 15 kDa mayor que la observada para IL-2Ra soluble (FIG. 6A). Correspondientemente, el análisis directo de la IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2-Ra de ratón purificada mediante SDS-PAGE fue coherente con una proteína monomérica heterogénea de 55-65 kDa (FIG. 6B), que es el tamaño esperado para una molécula de fusión de IL-2 (15 kDa) y IL-2Ra (40-50 kDa) (FIG. 6), donde IL-2Ra muestra heterogeneidad de tamaño debido a una extensa glicosilación variable (Malek y Korty, *J. Immunol.* 136:4092-4098, 1986). Una consecuencia inmediata de la transducción de señales dependiente de IL-2 es la fosforilación de tirosina de STAT5 (pSTAT5). El tratamiento de ratones con IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra de ratón dio como resultado una activación extensa y selectiva de pSTAT5 en Treg 30 minutos después del tratamiento (FIG. 7). Los estudios de dosis-respuesta mostraron que IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra de ratón afectó a una serie de actividades clave de Treg *in vivo* (FIG. 8). Estos efectos sobre los Treg incluyeron: 5 representación (FIG. 8A) y número (no mostrado) aumentados de Treg en el compartimento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>; regulación positiva de CD25 dependiente de IL-2 (FIG. 8B); proliferación aumentada según lo evaluado mediante la expresión del marcador proliferativo Ki67 (FIG. 8C); y fracción aumentada del subconjunto de Treg Klrg1<sup>+</sup> diferenciados terminalmente dependientes de IL-2 (FIG. 8D). Estos efectos fueron más sorprendentes para los Treg en el bazo y 10 el páncreas inflamado de ratones diabéticos no obesos (NOD). 1000 unidades de actividad IL-2, según lo medido en el bioensayo de CTLIL-2 convencional, asociadas a IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra mostraron niveles más bajos, pero efectos 15 fácilmente medibles sobre los Treg (FIG. 8). Se compararon ratones C57/BL6 tratados con IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra (2000 unidades de actividad IL-2) con ratones que recibieron IL-2 recombinante (25.000 unidades) o complejos agonistas de IL-2/anti-IL-2 (IL2/IC) (10.000 unidades de actividad IL-2) (FIG. 9). IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra fue mucho más 20 eficaz que IL-2 recombinante y ligeramente más eficaz que IL2/IC para inducir un aumento persistente de Treg y propiedades relacionadas (FIG. 9). Estos aumentos en Treg tolerogénicos se produjeron a niveles 5 y 12,5 veces más bajos de actividad IL-2 en comparación con IL2/IC e IL-2 recombinante, respectivamente. Cuando se tiene en cuenta la activación de pSTAT5 dependiente de IL-2 en Treg directamente *ex vivo* (FIG. 9), estos datos sugieren una semivida biológica de aproximadamente 72 horas para IL-2/IL-2Ra. Se sometieron ratones NOD prediabéticos a un tratamiento corto con cantidades bajas de IL-2/IL-2Ra (FIG. 10). Se observó un retraso en la aparición de la diabetes en aquellos 25 ratones que fueron tratados con 800 U de actividad IL-2 asociada a IL-2/IL-2Ra. Con respecto a la inmunidad, la aplicación de una única dosis alta de IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra (12.000 U de actividad IL-2) también impulsó sustancialmente las respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, especialmente células de memoria de larga duración (FIG. 11). Poco después de la vacunación (día 28), las células de memoria efectora (EM) CD44<sup>alto</sup> CD62L1<sup>bajo</sup> CD127<sup>alto</sup> dominaban el grupo de memoria; sin embargo, con el paso del tiempo, las células de memoria central (CM) CD44<sup>alto</sup> 30 CD62L<sup>alto</sup> CD127<sup>alto</sup> aumentaron y las células CM dominaron el conjunto de memoria 202 días después de la inmunización (FIG. 12). Por lo tanto, IL-2/(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>/IL-2Ra actúa de manera análoga a la IL-2 recombinante para estimular los Treg tolerogénicos e inmunosupresores y la inmunidad a través del aumento de las respuestas efectoras/de memoria T, pero presenta una farmacocinética mejorada mediante el suministro de dichas respuestas: 35 1) a niveles eficaces más bajos de actividad IL-2; 2) con respuestas biológicas más persistentes; y 3) conservación de la jerarquía con Treg que responden a dosis más bajas que los linfocitos efectores/de memoria T. Estos hallazgos respaldan la idea de que las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra representan una clase nueva y mejorada de fármacos que proporcionan actividad IL-2 para estimular selectivamente la tolerancia inmunitaria o la memoria inmunitaria cuando se administran a la dosis y la pauta adecuadas.

40 También se produjeron proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra que comprendían IL-2 humana e IL-2Ra humano (FIG. 1, FIG. 2B). Estos ADNc se expresaron en células CHO y las proteínas de fusión secretadas se purificaron en cromatografía de afinidad de Níquel basada en el marcador 6x-His. Las proteínas de fusión variaron en la longitud de los enlazadores de glicina-serina de manera análoga a las utilizadas para IL-2/IL-2Ra de ratón. Las 4 proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra humanas resultantes presentaron bioactividad IL-2 usando el ensayo CTLIL de ratón (FIG. 13A). El análisis por transferencia Western confirmó que la IL-2/IL-2Ra humana también mostró una banda heterogénea entre 55-60 kDa (FIG. 13B), coherente con las moléculas altamente glicosiladas esperadas para la IL-2 unida a IL-2Ra. Las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra con los enlazadores (G3S)3 y especialmente (G4S)4 pueden tener mayor actividad porque se observó menos proteína de fusión incluso aunque se cargó una cantidad equivalente de actividad IL-2 en cada calle (FIG. 13B). La capacidad de la proteína de fusión para inhibir la unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-2Ra, M-45 A257 y BC96, a células que portan IL-2Ra humano indica que el IL-2Ra de la proteína de fusión conservó suficiente estructura terciaria para unirse a estos anticuerpos (FIG. 14). Sin embargo, estas proteínas de fusión inhibieron sólo parcialmente la unión de un anticuerpo monoclonal (BC96) dirigido al sitio de unión a IL-2 de IL-2Ra, lo que implica que la IL-2 dentro de la proteína de fusión IL-2/IL-2Ra está espacialmente cerca del sitio de unión de IL-2Ra. Asimismo, se estimó que la actividad específica de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra humana y de ratón que contenían el enlazador (G3S)3 era de 80 y 2000 pM, respectivamente, por 1 unidad/ml de actividad bioactiva de IL-2. Estos valores son mucho más altos que los de la actividad de la IL-2 recombinante, que es de 10 pM a 1 unidad/ml. Las distintas actividades entre IL-2/IL-2Ra humana y de ratón se explican, al menos parcialmente, por una ineficacia relativa de la proteína de fusión humana para respaldar la proliferación de células CTLIL de ratón en el bioensayo en comparación con las proteínas de fusión de ratón o la IL-2 recombinante de ratón y humana (no mostrada). Estas actividades específicas relativamente bajas y los resultados de bloqueo de anticuerpos (FIG. 5 y FIG. 12) plantearon la posibilidad de que exista una interacción intramolecular específica entre IL-2 e IL-2Ra en el contexto de la proteína de fusión que limita la cantidad de IL-2 en la proteína de fusión para estimular las células que portan el IL-2R. Para someter a ensayo directamente esta idea, se mutaron dos restos de arginina a treonina y serina dentro del sitio de unión a IL-2 del IL-2Ra humano (véase Robb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5654-5658, 1988). Se detectó una bioactividad mucho 50 mayor asociada a estas proteínas de fusión de IL-2R mutante (FIG. 15); se estimó que la actividad específica de las proteínas de fusión IL-2/IL-2Ra mutadas era de aproximadamente 5 pM para 1 unidad/ml de actividad IL-2, un valor

muy similar al de la IL-2 recombinante. Por lo tanto, estos datos indican que la IL-2/IL-2Ra humana es biológicamente activa y un mecanismo de acción específico que explica la actividad prolongada de IL-2 en estas proteínas de fusión es a través de una interacción competitiva entre el resto de IL-2 con la región de unión a IL-2 de IL-2Ra de la proteína de fusión y con células que expresan el IL-2R.

Tabla 1. Sumario de secuencias

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción	
1	AA	Ser humano	IL-2 sin procesar	N.º de registro de GenBank AAB46883 IL-2 myrrqlsclaisavtneaptsskktkqjcehldqmlnginavnphrmifkymkratekthiqceekplevinatqskhfpredissain viwleksedhneyadetaveflhrwltitcslisit
2	AA	Ser humano	IL-2 - forma madura	GenBank AAB46883 con los primeros 20 aa eliminados apistskktkqjlehlldqmtqimyapxtrktkymkatekthiqce eskooleevhiksknfhfthdndhsitivhkhose ttmeyaderataveflhrwltitcslisit
3	AA	Ratón	IL-2 sin procesar	N.º de registro P04351 MYRQLQASCYTLILVLLNAPTSSSSTAEAQQQQQ QQQQQQPEEQIIMIQELISRMERVNKLPRMTFKEYL PKQATELKQDQCLEDLGPIRHVDLTQSKELEDAENF ISMRITWKLKGSDNTFCQDFEASATVDFLRWIAFCQSUSTSRQ
4	AA	Ratón	Forma madura de IL-2	Forma matura del N.º de registro P04351 APTSSSSTAEAQQQQQ QQQQQHQHEQLUMLIQELISRMERVNKLPRMTFKEYL PKQATELKQDQCLEDLGPIRHVDLTQSKELEDAENF ISMRITWKLKGSDNTFCQDFEASATVDFLRWIAFCQSUSTSRQ
5	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2R $\alpha$	N.º de registro de Genbank NP_000408.1 mdsylmglitlmnpqeqelddpcepratfamavkgitmnce kcrifnkgsymtqnsiswdrhdcqctssatntkqptoppe qkekrtenespnpovqaslgkrcrpwnealelyhvgnvyy qevqyrahpaeasvkmhgktrtqgcligmetspqgeerpq asperpesrsavttdfijctitemastmetstifteyqavacyflsllsigt wqrpkrsrti
6	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2R $\alpha$	Primeros 1-21 AA eliminados de NP_000408.1 elcdcppephatfkanaykegmloceckfrksgmktn ssbswdrgccqssattkqtpqeeherttenuuspmvpdas lpgheppveneceteninfvgmryqevgrahfgrasewckm thqktrtspqkgegmetsqfpgeekpaspcrpesetsvtttdf qditemadmetsthetgyavacyflsllsigtwqrpkartti
7	AA	Ser humano	Forma madura del dominio extracelular de IL-2R $\alpha$	ELDDDPPEPHATFKAAYKEGTMNLCEKRGFRIKSGLYMLTGNSHSISWDNGQ-QCTTSSATRNTTKQVTPQPEEQRKETTEMQSPMIVD QASPGHCREFPPEWNEATERYHVEWSQMYQQCQSYRAHRGPASEVKMTHGKTRWTQPLQCTGENETSQPGEEKPKQASPECPESETS CLVTTIDFQIQTENAVAMEISITTEQ

(continuación)

SEQ ID NO	AA/NT	Fuente	Descripción
8	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2Ra
9	AA	Ratón	Forma madura de IL-2Ra
10	AA	Ratón	Forma madura del dominio extracelular de IL-2Ra
11	AA	Enlazador [Gly3Ser]4	
12	AA	Enlazador [Gly3Ser]2	
13	AA	Enlazador [Gly3Ser]3	
14	AA	Enlazador [Gly3Ser]5	
15	AA	Enlazador Gly3	
16	AA	Ratón	Forma madura de IL-2 (Gly4Ser)4-dominio extracelular de IL-2Ra
17	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)4-dominio extracelular de IL-2Ra

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
18	AA	Ratón	Forma madura de IL-2 (Gly4Ser)5-domínio extracelular de IL-2R $\alpha$
19	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)5-domínio extracelular de IL-2R $\alpha$
20	AA	Ratón	Forma madura de IL-2 (Gly3Ser)4-domínio extracelular de IL-2R $\alpha$
21	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)4-domínio extracelular de IL-2R $\alpha$
22	AA	ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly4Ser)4-domínio extracelular de IL-2R $\alpha$

(continuación)

SEQ ID NO	AJ/NT	Fuente	Descripción
23	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser) 4-domino extracelular de IL-2Ra
24	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly3Ser) 4-domino extracelular de IL-2Ra
25	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser) 4-domino extracelular de IL-2Ra
26	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly3Ser) 3-domino extracelular de IL-2Ra
27	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser) 3-domino extracelular de IL-2Ra
28	NT	Ser humano	Secuencia Kozak optimizada líder de IL-2

(continuación)

ES 2 986 097 T3

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
30	NT	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)-dominio extracelular de IL-2R $\alpha$

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
31	NT	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)5'-dominio extracelular de IL-2R $\alpha$

(continuación)

SEQ ID NO	AA/NT	Fuente	Descripción
32	NT	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)-4-domínio extracelular de IL-2R <sub>α</sub>

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
33	NT	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)4-domino extracelular de IL-2Rq

ATGCCAGGGATGCCAAGTCACTCGTCATGCACTTAAGTCTTCGACCT  
GTCCACAAACAGTGCAAGTCAAGTTACAAAGAAACACAGCT  
ACAGCTGGAGCATTACTGCTGGATTAGCATGATTGATTCGATG  
TAAPATACAGAGAAUCCAAACUACCAGGATGCACTAACATTAAGT  
TTACATGCCAAGAAGGCCAACAGCACTGAACATGAAACATGCTTCAG  
AAAGAAGAACTCAAAACCCUUGGGAAAGGCTAAATTAGCTCAAGGC  
AAAACCTTCACITTAAGCCAGGGACTTAATCAGGAAATATCAGGAA  
ATAGCTTCGAACTTAAGGGATCTGAAACATTAATGTTGAAATA  
TGCTGATGAGACAGCAACCATGAGATTCGAGATGAGATGAA  
CCGTTTGGCACAGCAATCAATTGAAACACTGACBGGGAGGTTGGGG  
Ieabbts9gg  
GATTCACACGCCACATTCACAGGCAATGCAAGGAAAGGAAACGA  
TGTTGAACCTGTAATGGAAAGGGTTCCGAGAATAAAAAGGG  
GTGACCTATATGCTGTAAGGAACCTAGGAAACTTGCGCTTCGGAA  
CAACCAATGTCATGATGAAACCTGCACTCGGGAAACACAGAC  
AAAGTGACCCUAACTGAAAGAACAGAAAGGAAAACACAGA  
AAATGCAAACTGCAATGTAAGGCAATGAAAGGGGGGTTCCAGTC  
ACTGGAGGAACCTGCACTGAACTGAAAGGAAATGAGGCAACAGGAAAT  
TTATCAATTGCTGGTGGGGGGCAATGGTTTATTATCACTGGCTCAGG  
GATACAGGCTCTAACAGGAGCTGACAGGCTCTGAAAGGCTGAAATG  
ACCCACCGGAAACGAAAGGTTGACCCDAGGCGACGCTCATATEGAG  
GTGAAATGAAAGGAACTGAGGAGTTGCACTGGGGGGGGGGGGGG  
AAGGCGGAAGGECGCTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT  
CAAGAGTTTCAAAATACAGGCAAGAAATGGGTGCAACCTGGAGCG  
TCCATATTACACAGGAACTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT  
TAATAA

ES 2 986 097 T3

(continuación)

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
38	AA	Ser humano	forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)5-domino extracelular de IL-2R $\alpha$
39	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly4Ser)5-domino extracelular de IL-2R $\alpha$ humana
40	AA		Secuencia enlazadora (Gly4Ser)4
41	AA		Secuencia enlazadora (Gly4Ser)5

ES 2 986 097 T3

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
4.2	NT	ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)-3-dominio extracellular de IL-2R $\alpha$
4.3	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly3Ser)-2-dominio extracellular de IL-2R $\alpha$
4.4	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)-2-dominio extracellular de IL-2R $\alpha$

(continuación)

SEQ ID NO	AA/NT	Fuente	Descripción
45	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly3)-dominio extracelular de IL-2Ra TEILKLOCLEELKPEEVILAQSNHFLRPPDLSIHNIVILEKSEETTFF MCEADETATVNEFLNRMWTCQGSLISTLGGEECDDPPEPHATPKA MAYVEGSTMMCECETEGFRHKSSSVMUCLTMSSSHSSMDNOQCTSSA TRNTTKOYTOPEEDEKERKTTEMSPMPWQYDQASLSPHCREPPWM EATERHYFVNG2MVWVYOCVQEPHALHRGAESVCANTHGKTFWTPQ QUCIGEMETSGPGEKEPKPSPEERPESETSCLVITTEDECIOTEMAAAT METSFTTEYQ
46	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3)-dominio extracelular de IL-2Ra MDPACULLSCSLAVLNAPPSSTKTKTOLERLLDLCMUGKHN YKRPKLTRALTEKFENPKRATKLHLCCLEELKPLKEELNLAGSKNPHL RPLQLSNKIVYLERKGSETFMCEYADELTATVBLNMRWTHCQGSLISLT GGEEELCDDPPEPHATPKAMAYVEGTMLNCECERFFRKKGCSLVMLC TENSSSHSSMDNOQCTSSATFTNTKQYTOPEEDEKERKTTEMSPMPO PVDAISLPFHCREPPWMEEAERYHFYQCMVYQCYQSYRLPR GPASEVKWMTIGKTRWTPOLICGEMETSGPPEEKPSPEERPESES ETSGLVTTDIFOLCETEMAATMETSFTTEYQ
47	NT	Ser humano	Forma sin procesar IL-2 (Gly3Ser)2-domínio extracelular de IL-2 Ra ATGCCAGGGATGCAACTTGCTGCACTTGCTGCAAGTCTGCAAGAACACAGCT GTGCAAAACAGTGCACTTGCTGCAAGTCTGCAAGAACACAGCT ACAGCTGGCGATTACTCTGCTTACAGTAACTTGCTGCAAGAACACAGCT TAAATTAACAGGATAACGCAACGCAACGCAACGCAACGCAACGCA TTAGCATGCGCAAGAGGCGAACACGCAACGCAACGCAACGCAACGCA AAGGAGAACCTGAAACACCTGCGAAAGGCGAACACCTGCGAAAGG AAAACCTTCACTTAAGCTAAAGGCGATCTGCAAAACATTTAGCTGAAAG ATAGCTTCTGCAACTTAAGGCGATCTGCAAAACATTTAGCTGAAAG TGCTGATGAGCACGCGAACCTTCTGAAAGGCGATCTGCAAAACATTTAGCTGAAAG CCHTTTGICAACGAAACGATCTGCAAAACATTTAGCTGAAAGGCG tcaGAGCTTGCGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGG AAASCCAAGGCTTGCGGATCAAGGAAAGGCGATGAGGATGAGGATGAGG AGAGGAGTTCCGGGATAAAAGGGGGGCGCTTACGCTTATGCTCTGCT ACACGAAACTCTACCCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT AAGCTCTGGCGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGG AAGGAGGAGAACGAGAACGAGAACGAGAACGAGAACGAGAACGAG GGCGATGGCTGCGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGG CATGCGAAATGAGGCGAACGAGGCGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGG GCAGATGGGTTTATATCGCTGCGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGG GAGGCTCTGCTGAGGAGGCGCTGCGGAAATGAGGCGAACGAGGCG GTGGCGCCAGGCGAACGAGGCGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGG AGTTCCCGAGGTGAGGAGACTTCTGCTGCTGCGGATGAGGATGAGG TGAGAGGTGAGGAGACTTCTGCTGCGGATGAGGATGAGGATGAGG GACGAGAAATGCGCTGAGGAGGCGCTGAGGATGAGGATGAGGATGAGG ACCGCGGTGCGACATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGAC

(continuación)

SEQ ID NO	A/A/NT	Fuente	Descripción
48	NT	Ser humano R <sub>a</sub>	Foma sin procesar IL-2 (Gly3)-dominio extracelular de IL-2  ATGGACAGGATTCGAACTCTTGCTTGCATTTCGACTCTAGTCCTGGACTT GTCACAAACAGTCGCAACTCTAAGTCCTACAAAGGAAACACAGCT ACAATGGAGGATTCTACGTGGATTTGAATTTGAATTTGAATGGAAAT TAATAATTACAGAGAACGCGGATTCAGCTGGATGTTGAATGGATGGAAAT TTACATGCGCCAGAACGGCGAACAGACTGAACTGAACTGAACTGAACT AAGAGAACTCAACACCTGTTGGAACTGTTGGCAACACTGAACTGAACT AAGAACCTTCACTTAAGAAGGAGGACTTAACTCAGGAATAATCAAACTTA ATAGCTTCGGAAACAAAGGGATCTGAAACAACTTAACTGAACTGAACT TGCTGTGAGACAGAACGAACTTGGAAATTCTGAAAGATGCTGGACATTTA CCCTTTGTCAAAGCTCATCTCAACCTGACTGTTGGGGTGAACCTCTGT GACCGATGCGCGAGAGAGGACCGACGACGACGACGACGACGACGACG CTTACAAAGGAAAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG GCACAAATAAAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG ACGAACTCTCCCTGGACGACGAACTTGGAAATTCTGAACTGAACTGAACT TGCGAAACAAACGAAACGAAACGAAACGAAACGAAACGAAACGAAACGAA GAAGGGAAAACGAGAAATGCAAGTGGAAAGGACCTCAACCTGAAACGAA AAACGAACTGCTGGGGTCACTGCGGGGAACTGAAAGTGGCAATGCGAAAT GAAGGCAACAGAGAGAGAAATTCTCATTTGGTGTGTTGGGGGGGGGGGG TTAACAGTGGGGTCACTGGGGTCACTGGGGTCACTGGGGGGGGGGGGGG AGAGGGCTCTGCAAAATGACCCACGGGAGACAGCTGGGGGGGGGGGGGG CCACGCTCATTCGAACAGCTGAAATTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG AAGAGCAACGCTCACCCAACGCCAACGCCAACGCCAACGCCAACGCC TTCTCTGCTGCTGACAAACAGAACTTCAATTAACAGAGGAGGAGGAGGAG TEGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG ATCAACCATGACCACTACAACTAA

ES 2 986 097 T3

continuación)

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
55	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)5-dominió extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polilisidina
56	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)4-dominió extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polilisidina
57	AA	Ratón	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)3-dominió extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polilisidina
58	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)2-dominió extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polilisidina
59	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)3-dominió extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polilisidina

(continuación)

SEQ ID NO	AA/ NT	Fuente	Descripción
60	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly3Ser)4-dominio extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polihistidina
61	AA	Ser humano	Forma sin procesar de IL-2 (Gly4Ser)4-dominio extracelular de IL-2 R $\alpha$ + espaciador de glicina y región de polihistidina
62	AA	Ser humano	Forma madura de IL-2 (Gly3Ser)3-dominio extracelular de muIL-2 R $\alpha$

ES 2 986 097 T3

(continuación)

(continuación)

SEQ ID NO	A/A N/T	Fuente	Descripción
65	N/T	Ser humano	Forma sin procesar de II.-2 (Gly4Ser)4-dominió extracelular de multil-2 Rv

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será obvio que pueden ponerse en práctica determinados cambios y modificaciones dentro del ámbito de la presente invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:
  - 5 (a) un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2); en donde el primer polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; y
    - (b) un segundo polipéptido, fusionado en fase de lectura con el primer polipéptido por un enlazador, en donde el enlazador es la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y en donde el segundo polipéptido comprende un dominio extracelular del receptor alfa de interleucina-2 (IL-2Ra), en donde el segundo polipéptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; que tiene actividad biológica del dominio extracelular de IL-2Ra; en donde la proteína de fusión tiene una actividad IL-2 aumentada en comparación con la IL-2 nativa; o en donde la proteína de fusión tiene una estimulación por IL-2 persistente aumentada de linfocitos portadores de IL-2R *in vivo* en comparación con la IL-2 nativa.
  - 15 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el primer polipéptido que comprende IL-2 tiene al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.
  - 20 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el segundo polipéptido que comprende el dominio extracelular de IL-2Ra tiene al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.
  - 25 4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende
    - (a) la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 26, 27, 36, 37, 57 o 59; o
     - (b) una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 26, 27, 36, 57 o 59.
  - 30 5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de fusión comprende:
    - (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62; o
     - (b) una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 62.
  - 35 6. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
  7. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la reivindicación 6, en donde la célula hospedadora es opcionalmente una célula CHO o una célula COS.
  - 40 8. Un método de producción de la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo el método expresar el polinucleótido que codifica la proteína de fusión en la célula hospedadora de la reivindicación 7 y recuperar la proteína de fusión producida de este modo.
  - 45 9. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la disminución de la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite.
  - 50 10. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria; opcionalmente, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis sistémica, enfermedad de injerto contra hospedador, psoriasis, alopecia areata y vasculitis inducida por el VHC.
  - 55 11. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión comprende de  $10^3$  a  $10^6$  UI de actividad IL-2 por adulto o  $10^4 \pm 100$  veces de actividad IL-2 por adulto.
  - 60 12. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la potenciación de la inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto que lo necesite o para superar una respuesta inmunitaria suprimida a una vacuna en un sujeto que lo necesite.
  13. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la proteína de fusión y la vacuna han de administrarse simultáneamente.
  - 65 14. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la proteína de fusión y la vacuna han de administrarse secuencialmente en cualquier orden.

15. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde dicha vacuna es una vacuna contra el cáncer.
- 5    16. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión comprende al menos de  $10^4$  a  $10^7$  UI de actividad IL-2 por adulto o  $10^5 \pm 10$  veces de actividad IL-2 por adulto.
- 10    17. La proteína de fusión para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-16, en donde el sujeto es un ser humano.

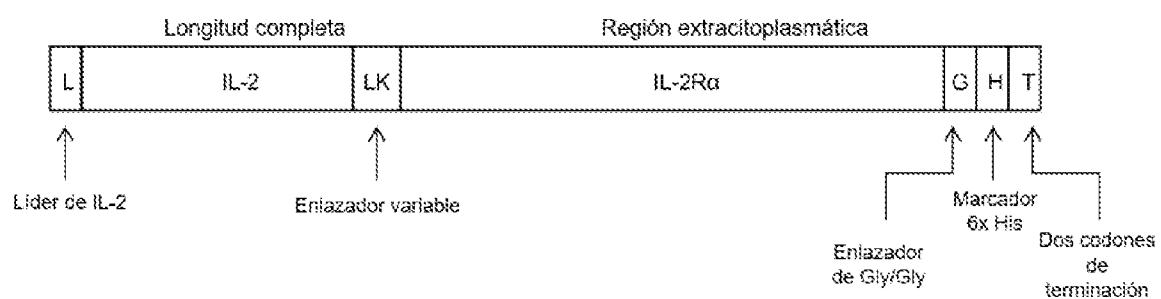


FIG. 1

2/16

FIG. 2A

# ES 2 986 097 T3

3/16

IL-2	MYRMQLLSCIALSIALVNTNSAPTSSTKKTQLQLEHILLLDLQMI LNGINNYKNPKLTPEML MYRMQLLSCIALSIALVNTNSAPTSSTKKTQLQLEHILLLDLQMI LNGINNYKNPKLTPEML MYRMQLLSCIALSIALVNTNSAPTSSTKKTQLQLEHILLLDLQMI LNGINNYKNPKLTPEML MYRMQLLSCIALSIALVNTNSAPTSSTKKTQLQLEHILLLDLQMI LNGINNYKNPKLTPEML MYRMQLLSCIALSIALVNTNSAPTSSTKKTQLQLEHILLLDLQMI LNGINNYKNPKLTPEML
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	
IL-2	TPKFYMPKKATELKHLQCLEEEBLKPLETEEVNLNLAQSKNPHLRPRDLISNINVIVLRLKGSE TPKFYMPKKATELKHLQCLEEEBLKPLETEEVNLNLAQSKNPHLRPRDLISNINVIVLRLKGSE TPKFYMPKKATELKHLQCLEEEBLKPLETEEVNLNLAQSKNPHLRPRDLISNINVIVLRLKGSE TPKFYMPKAATELKHLQCLEEEBLKPLETEEVNLNLAQSKNPHLRPRDLISNINVIVLRLKGSE TPKFYMPKAATELKHLQCLEEEBLKPLETEEVNLNLAQSKNPHLRPRDLISNINVIVLRLKGSE
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	
IL-2	TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLT----- TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGCGS-----GGGSELCDDP TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGCGS-----GGGGGGGSELCDDP TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGCGGSGGG-----GGGSGGGSELCDDP TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGCGGSGGGGSGGGGSELCDDP TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGCGGSGGGGSGGGGSELCDDP
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	
IL-2	PEIPHATFKAMAYKECTMLNCECKRGFRRIKSQSLYMLCTGNSHESWDNQCQCTSSATR PEIPHATFKAMAYKECTMLNCECKRGFRRIKSQSLYMLCTGNSHESWDNQCQCTSSATR PEIPHATFKAMAYKECTMLNCECKRGFRRIKSQSLYMLCTGNSHESWDNQCQCTSSATR PEIPHATFKAMAYKECTMLNCECKRGFRRIKSQSLYMLCTGNSHESWDNQCQCTSSATR PEIPHATFKAMAYKECTMLNCECKRGFRRIKSQSLYMLCTGNSHESWDNQCQCTSSATR
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	
IL-2	NTTKQVTPQPEEQKERNNTTEMQSPMOPVVDQASLPGHCREPSPWNEATERIYRFVVVGQMV NTTKQVTPQPEEQKERNNTTEMQSPMOPVVDQASLPGHCREPSPWNEATERIYRFVVVGQMV NTTKQVTPQPEEQKERNNTTEMQSPMOPVVDQASLPGHCREPSPWNEATERIYRFVVVGQMV NTTKQVTPQPEEQKERNNTTEMQSPMOPVVDQASLPGHCREPSPWNEATERIYRFVVVGQMV
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	
IL-2	YYQCVQGYRALHKGFAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFFGEEKPQASPEGRE YYQCVQGYRALHKGFAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFFGEEKPQASPEGRE YYQCVQGYRALHKGFAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFFGEEKPQASPEGRE YYQCVQGYRALHKGFAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFFGEEKPQASPEGRE
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	
IL-2	SETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQQGHNNNNNN SETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQQGHNNNNNN SETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQQGHNNNNNN SETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQQGHNNNNNN SETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQQGHNNNNNN
IL-2 - (G3S) 2-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 3-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G3S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2 - (G4S) 4-IL-2R $\alpha$	
IL-2R $\alpha$	

FIG. 2B

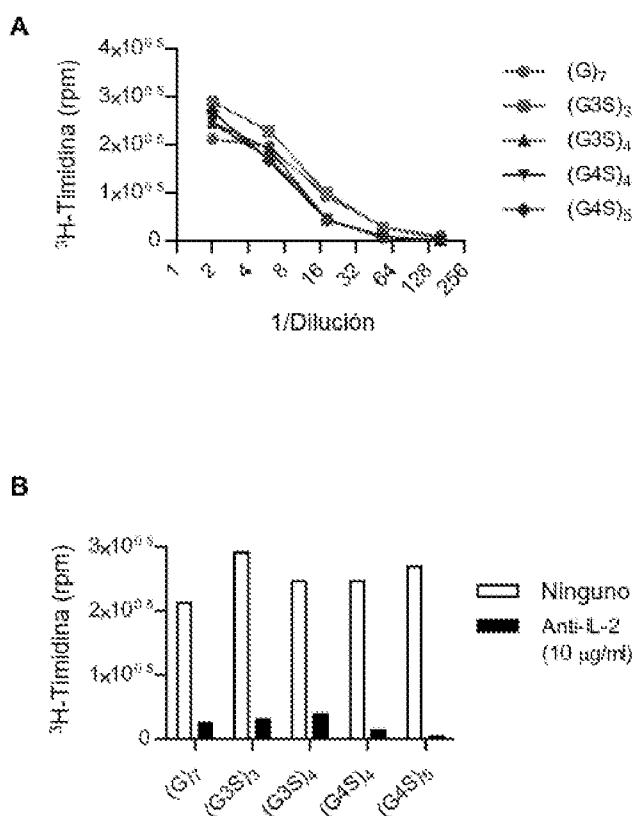


FIG. 3

# ES 2 986 097 T3

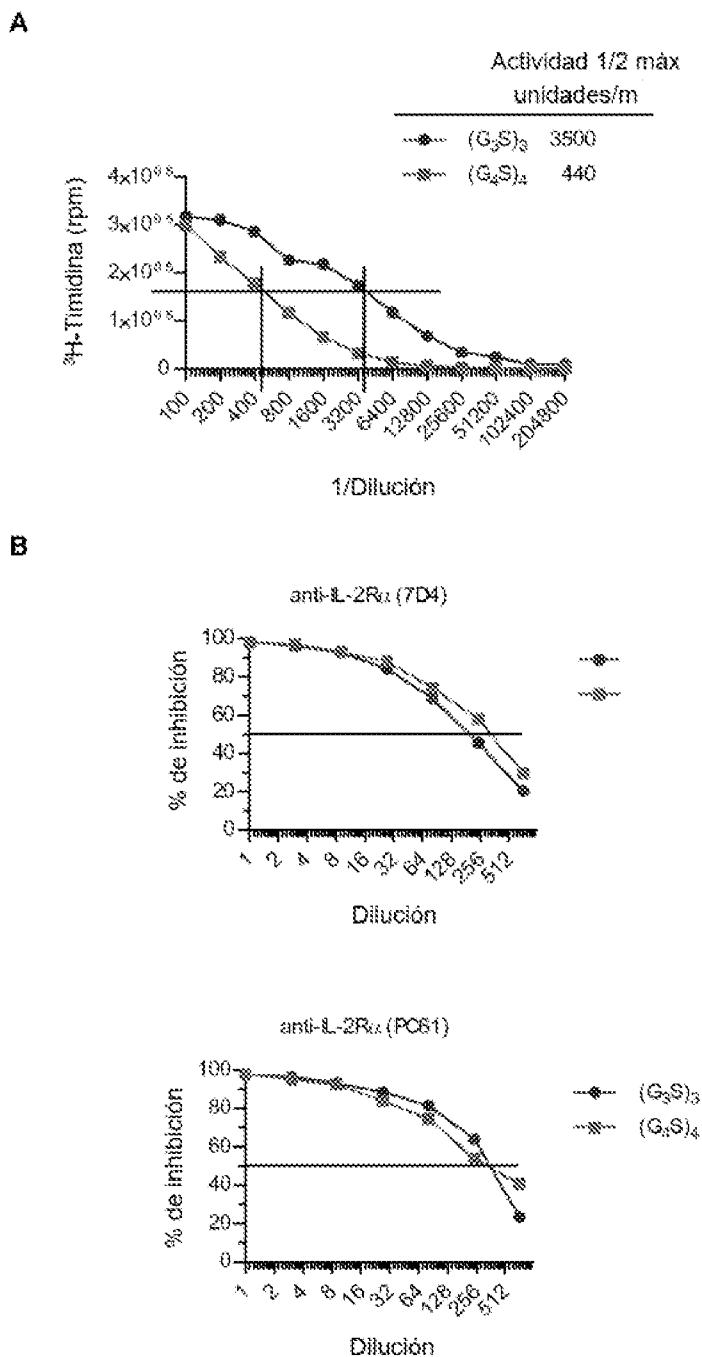


FIG. 4

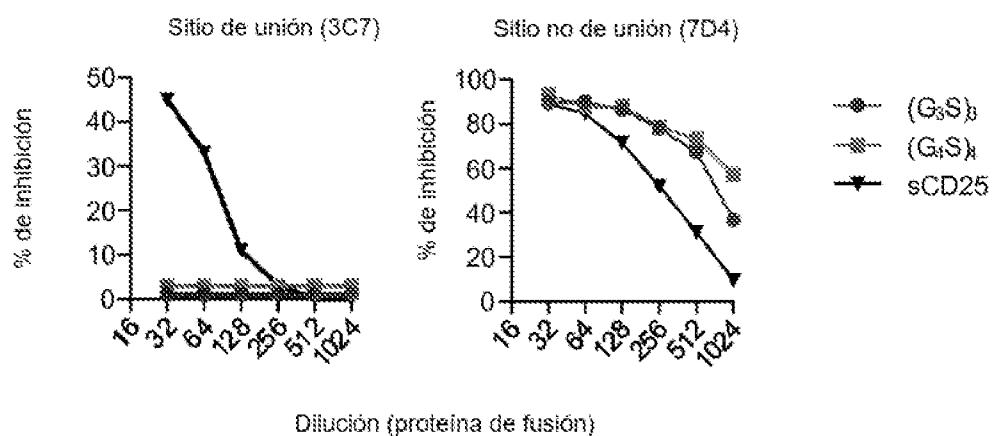


FIG. 5

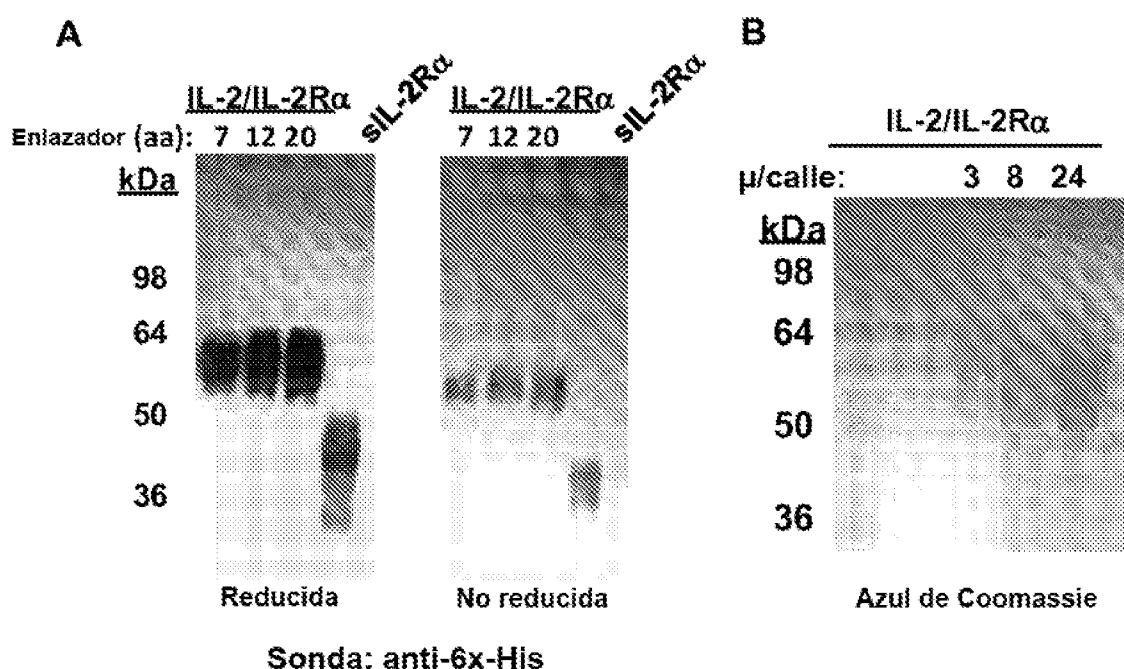


FIG. 6

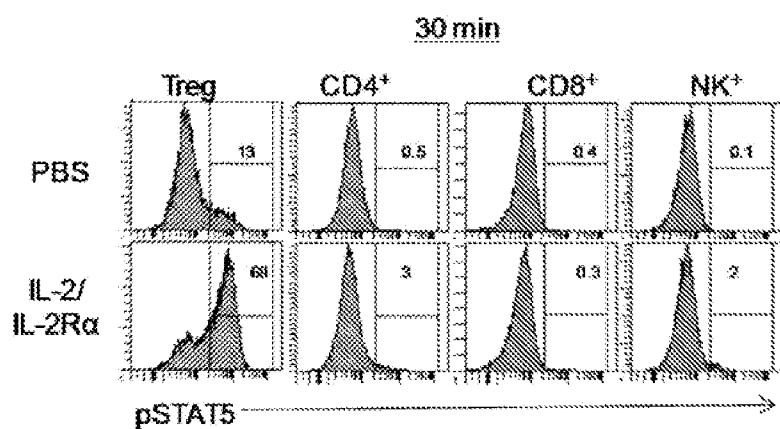


FIG. 7

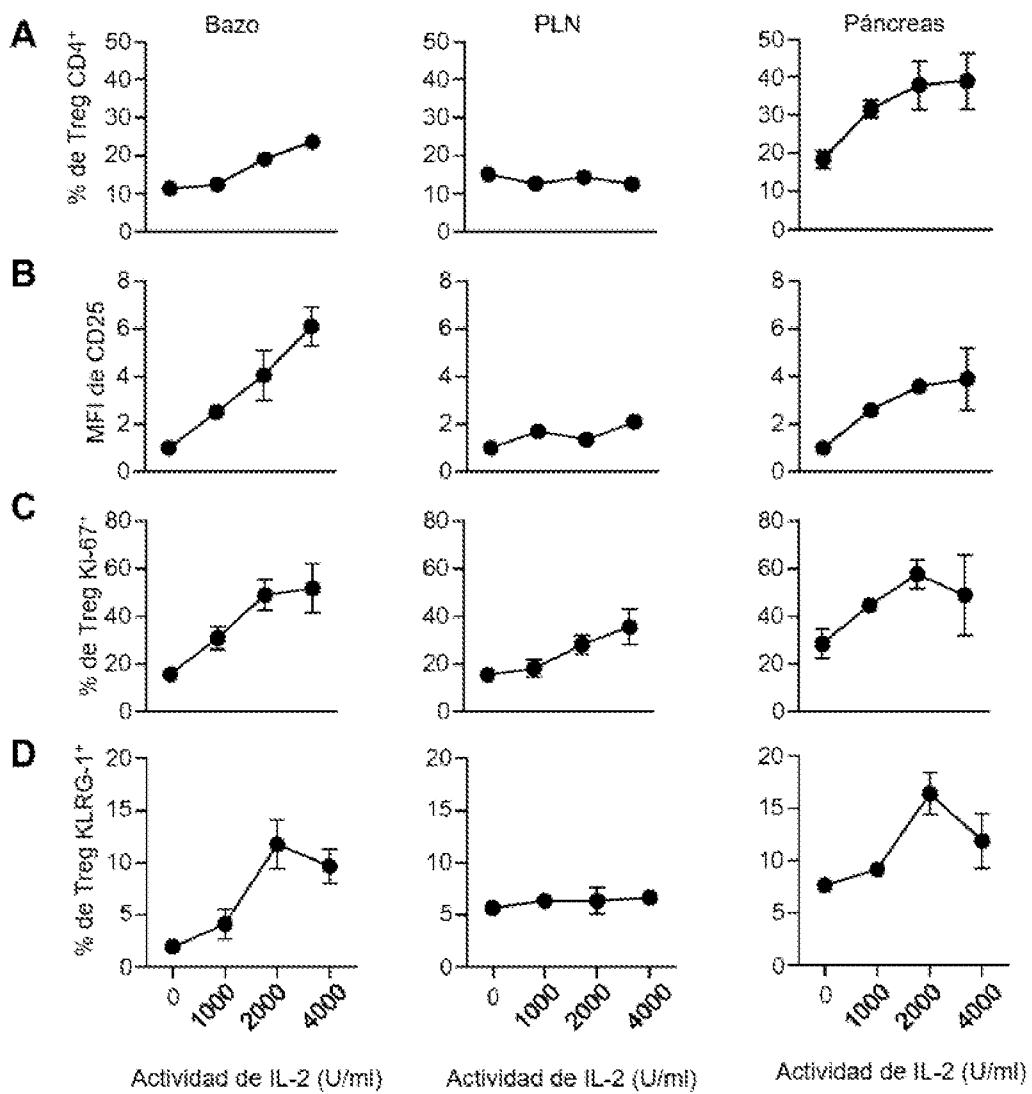


FIG. 8

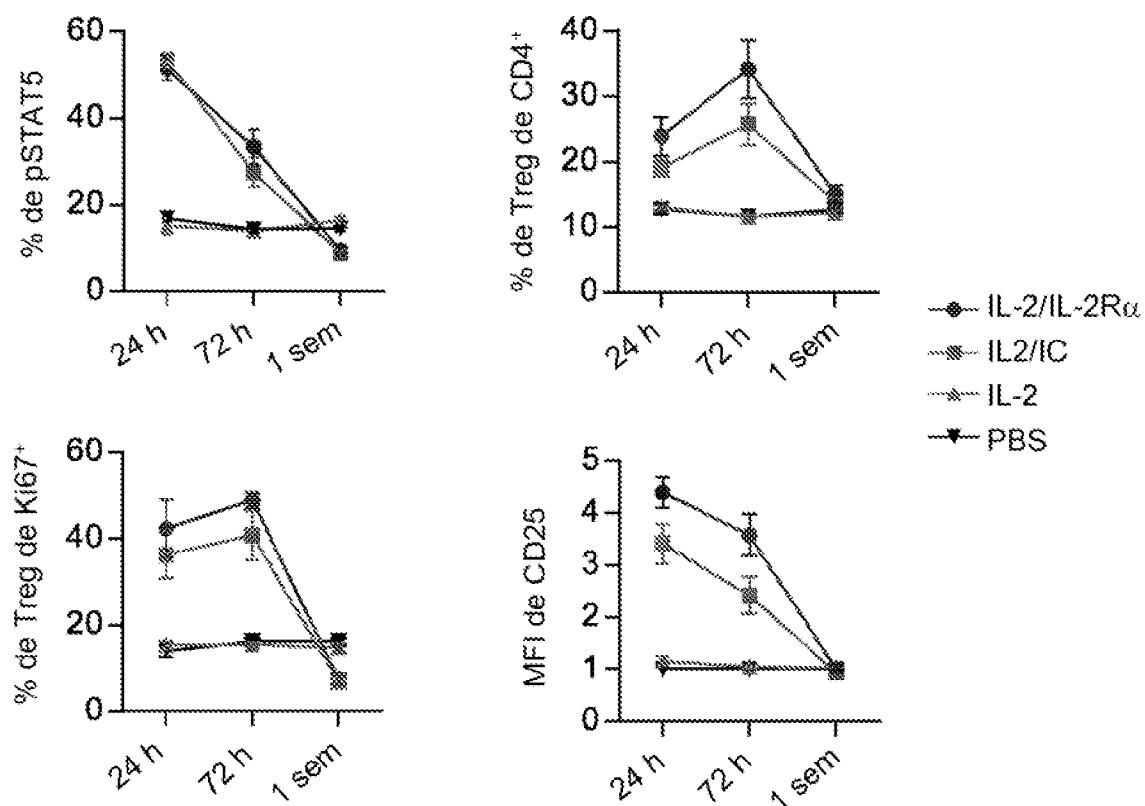


FIG. 9

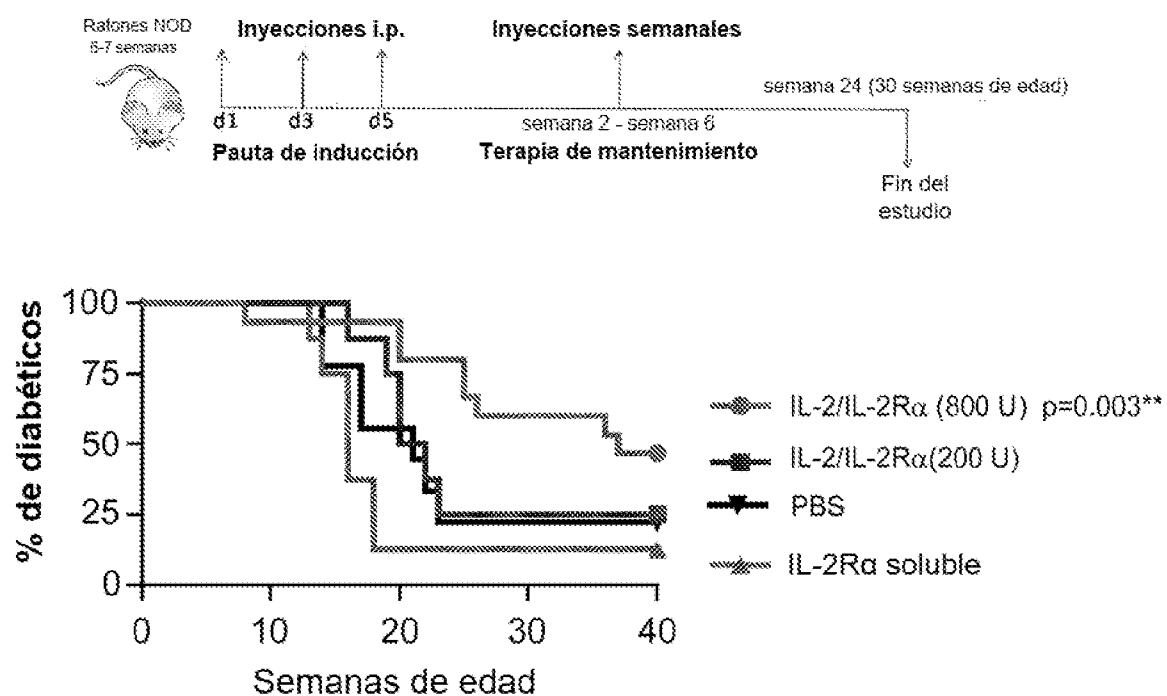


FIG. 10

# ES 2 986 097 T3

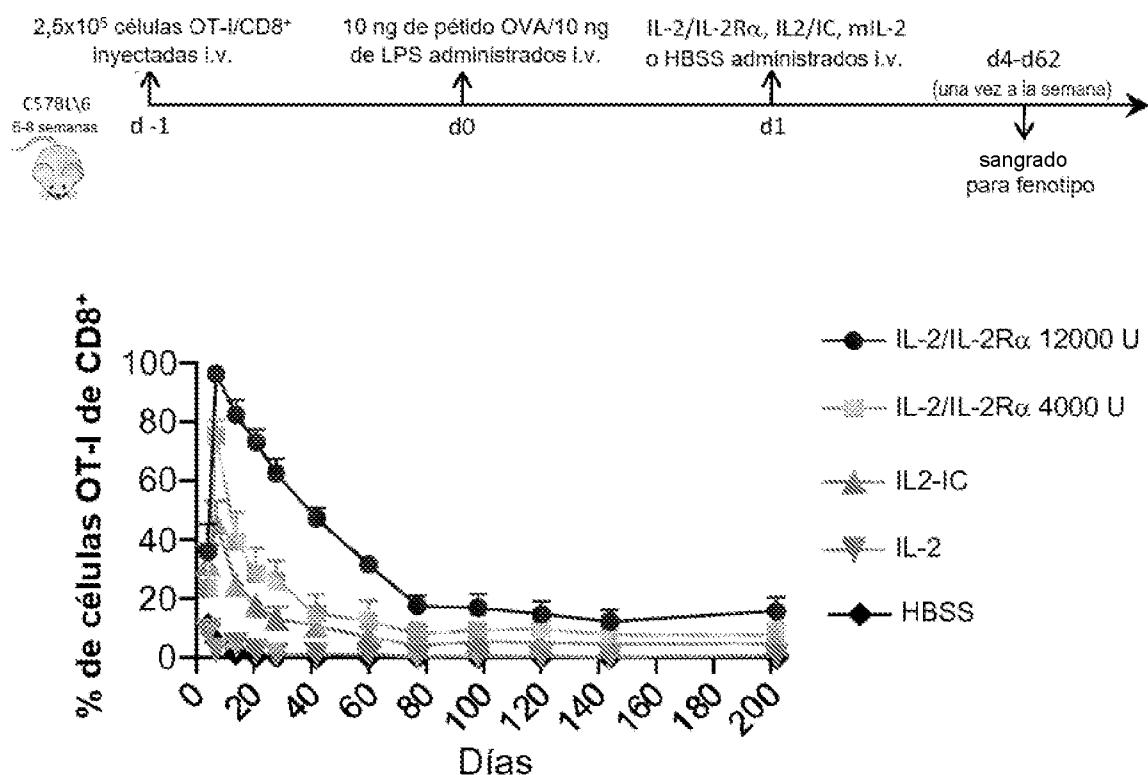


FIG. 11

# ES 2 986 097 T3

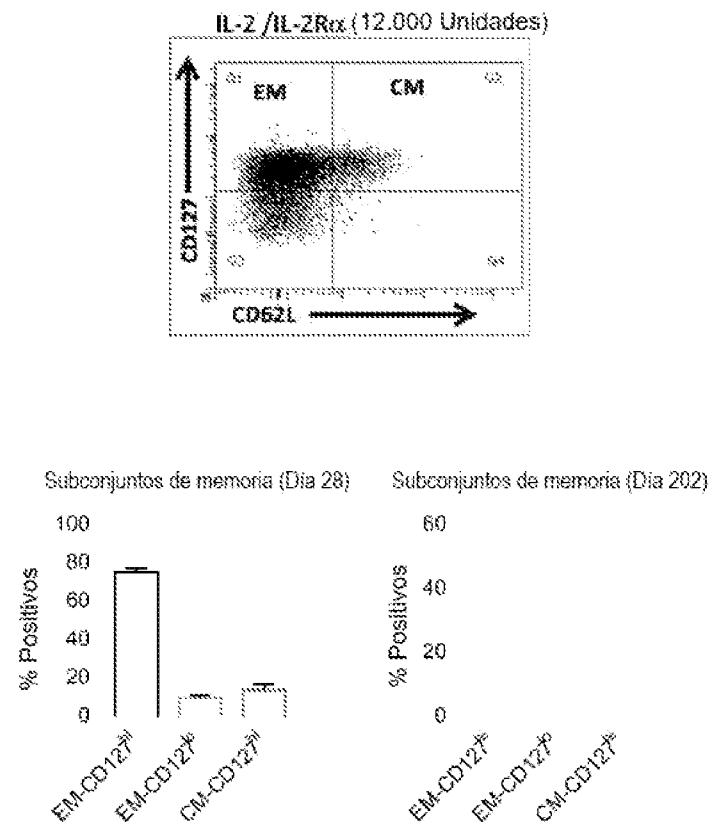


FIG. 12

ES 2 986 097 T3

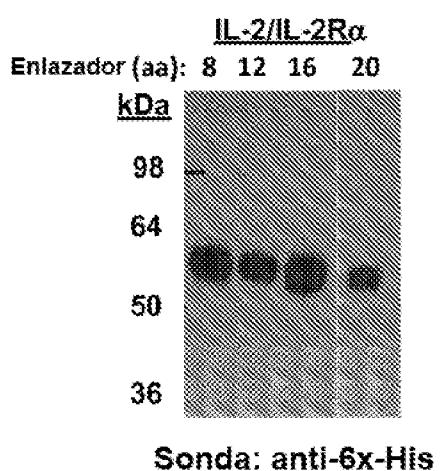
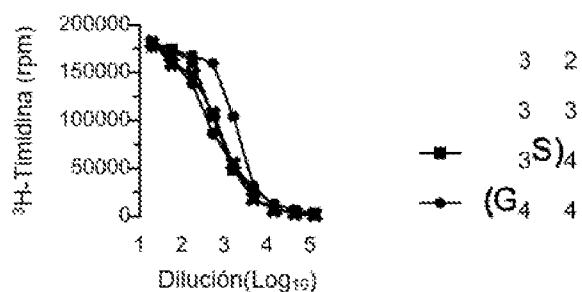


FIG. 13

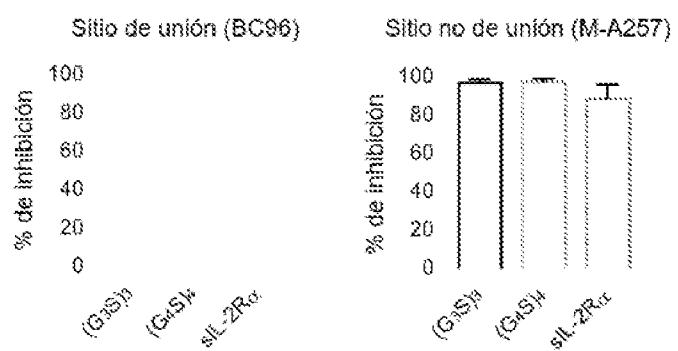


FIG. 14



FIG. 15