

**PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE INTERLEUCINA 2/RECEPTOR DE
INTERLEUCINA-2 ALFA Y MÉTODOS DE USO**

Campo de la Invención

5 La materia objeto descrita actualmente se refiere en general a métodos y composiciones para modular la respuesta inmune que emplea una proteína de fusión de interleucina-2/receptor de interleucina-2 alfa.

Antecedentes de la Invención

10 La interleucina-2 (IL-2) es un producto biológico que se ha utilizado en los intentos de aumentar la respuesta inmune en pacientes con cáncer y VIH/AID. Más recientemente dosis más bajas de IL-2 se han utilizado para aumentar selectivamente la tolerancia para suprimir
15 las respuestas inmunes no deseadas asociadas con el ataque autoinmune de los propios tejidos. Es importante destacar que estas dosis bajas de IL-2 no han mostrado ningún signo de mejora o re-activación de las células T autorreactivas. Sin embargo, IL-2 tiene inconvenientes
20 importantes como un agente terapéutico, incluyendo una semivida muy corta *in vivo*, lo que limita su eficacia y toxicidad a dosis altas. Por estas razones se necesitan nuevos tratamientos biológicos de IL-2 que tengan farmacocinética mejorada y durabilidad de las respuestas
25 de uso.

Sumario de la Invención

Se proporcionan varios métodos y composiciones que se pueden emplear para modular el sistema inmune. Las composiciones incluyen una proteína de fusión que comprende:

- 5 (a) un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2) o una variante funcional o fragmento de la misma; y (b) un segundo polipéptido, fusionado en el marco de lectura al primer polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende un dominio extracelular del receptor de interleucina 2 alfa
10 (IL-2R α) o una variante funcional o fragmento del mismo, y en donde la proteína de fusión tiene actividad IL-2.

Se proporcionan varios métodos para disminuir la respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de una disminución en la respuesta inmune
15 una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α descrita en este documento.

Se proporcionan además métodos para aumentar la respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad de un aumento en la respuesta inmune una
20 cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α descrita en este documento. Se proporcionan además métodos para aumentar la actividad de las células reguladoras T.

Los métodos adicionales que incluyen mejorar la
25 inmunogenicidad de una vacuna o la superación de una

respuesta inmune suprimida a una vacuna en un sujeto, que comprende: (a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α descrita en este documento; y, (b) administrar al sujeto una vacuna, en donde la proteína de fusión aumenta la inmunogenicidad de la vacuna o supera la respuesta inmune suprimida a la vacuna.

Breve Descripción de las Figuras

La Fig. 1 proporciona un esquema de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α , en donde el péptido L = líder, LK = región de enlace, G = glicina, H = histidina, y T = codón de terminación.

Las Figs. 2A y 2B proporcionan las secuencias de proteínas deducidas de los ejemplos no limitantes de proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α . La Fig. 2A proporciona las secuencias de proteínas deducidas de ejemplos no limitantes de proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α de ratón. Las secuencias de IL-2/IL-2R α de ratón se muestran por encima y por debajo, respectivamente, de las proteínas de fusión. La secuencia indicada como IL-2 se establece en la SEC ID NO: 3; la secuencia indicada como IL-2-(G4S)4-IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 54; la secuencia indicada como IL-2-(G4S)5-IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 55; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)4-IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 56; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)3-IL-2R α se establece en la

SEC ID NO: 57; y el dominio extracelular de IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 10. La Fig. 2B proporciona las secuencias de proteínas deducidas de ejemplos no limitantes de proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α de humano. Las 5 secuencias de IL-2 y IL-2R α de humano se muestran arriba y más adelante, respectivamente, de las proteínas de fusión. La secuencia indicada como IL-2 se establece en la SEC ID NO: 1; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)2-IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 58; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)3-IL- 10 2R α se establece en la SEC ID NO: 59; la secuencia indicada como IL-2-(G3S)4-IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 60; la secuencia indicada como IL-2-(G4S)4-IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 61; y el dominio extracelular de IL-2R α se establece en la SEC ID NO: 7.

15 Las Figuras 3A y 3B muestran la bioactividad de las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α . Las células COS-7 se transfectaron con los ADNc de fusión de IL-2/IL-2R α con los enlazadores indicados. Los sobrenadantes de estas células se cultivaron con blastos de células T activadas con anti-CD3 20 para evaluar la actividad de IL-2. (fig. 3A) respuestas proliferativas de los blastos T después de diluciones de las proteínas de fusión indicadas. (fig. 3B) Efecto de anti-IL-2 en la proliferación estimulada por una dilución 1:2 del sobrenadante de cultivo que contiene las proteínas de fusión 25 indicadas.

Las Figs. 4A y 4B muestran la actividad de las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α purificadas. Los sobrenadantes de células CHO transfectadas se utilizaron para purificar IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α e IL-2/(Gly₄Ser)₄/IL-2R α por cromatografía de 5 afinidad a base de níquel para la etiqueta 6x-His. (fig. 4A) la medición de la bioactividad de IL-2 por la proliferación de blastos de células T anti-CD3 con la proteína de fusión purificada indicada. (fig. 4B) El efecto de cada proteína de fusión purificada para inhibir la unión de PC61 y anticuerpos 10 monoclonales 7D4 anti-IL-2R α , dirigidos al sitio de unión sin ligando, a blastos de células T activadas con anti-CD3.

La Fig. 5 muestra que un anticuerpo monoclonal anti-IL-2R α que se dirige al sitio de unión de IL-2 de IL-2R α no puede unirse a la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α . Las 15 proteínas de fusión purificadas con enlaces variables, como se indica, se incubaron primero con el anticuerpo monoclonal 3C7 anti-IL-2R α , dirigido al sitio de unión del ligando de IL-2R α o el anticuerpo monoclonal 7D4, dirigido a un sitio de unión sin ligando de IL-2R α . La capacidad de 3C7 o 7D4 para 20 unirse a la superficie celular de IL-2R α se evaluó utilizando células EL4 transfectadas con IL-2R α .

Las Figuras 6A y 6B muestran las propiedades bioquímicas de IL-2/IL-2R α purificada. (fig. 6A) IL-2/IL-2R α purificada se sometió a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no 25 reductoras; IL-2/IL-2R α se visualizó mediante análisis de

Western blot mediante el sondeo con un anticuerpo dirigido a la etiqueta 6x-His de la proteína de fusión. (fig. 6B) La cantidad indicada de IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α purificada se sometió a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras seguido por
 5 tinción con azul de Coomassie.

La figura 7 muestra el efecto de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α sobre la transducción de señal dependiente de IL-2 *in vivo*. Los ratones C57BL/6 recibieron una sola inyección i.p. de IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α (4000 unidades de la
 10 actividad de IL-2) y los niveles de pSTAT5 en las poblaciones de células de bazo indicadas fueron evaluadas inmediatamente. Los niveles pSTAT5 se determinaron 0.5 hr después de la inyección de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α . Para las células T CD4⁺, las células fueron reguladas a células Treg
 15 Foxp3⁺ excluidas

Las Figs. 8A - 8D muestran el efecto de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α en células Tregs *in vivo*. Los ratones NOD fueron inyectados i.p. 3 veces (días 1, 3, 5) con la cantidad indicada de la actividad de IL-2 asociada con IL-
 20 2/(G₃S)₃/IL-2R α . El efecto sobre las Tregs se evaluó para el bazo, los ganglios linfáticos pancreáticos (PLN) y el páncreas 24 horas después de la última inyección. Se evaluó la proporción de Tregs en las células T CD4⁺; la intensidad fluorescente promedio (MFI) para la expresión de CD25 por
 25 Tregs después de la normalización a la expresión de CD25 por

Tregs de los ratones tratados con el control; el estado de proliferación de Tregs como es evaluado por la expresión del marcador proliferativo Ki67; y el % de Tregs que expresa Klrp1, que marca una subpoblación terminalmente diferenciada
 5 dependiente de IL-2.

La Fig. 9 muestra la comparación de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α y IL-2 recombinante para inducir cambios en las células Treg *in vivo*. Los ratones C57BL/6 fueron inyectados i.p. 3 veces (día 1, 3, 5) con IL-
 10 2/(G₃S)₃/IL-2R α (2000 unidades), IL-2 humana recombinante (25,000 unidades) o complejos preformados de anti-IL-2 (Jes-6,1; 5 g) e IL-2 de ratón (10,000 unidades) (IL2/IC). El efecto sobre las Tregs se evaluó para el bazo 24, 72 hr y 1 semana después de la última inyección. Las Tregs se evaluaron
 15 como se describió en la Figura 8.

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

La Figura 11 demuestra que altas dosis de IL-2/IL-2R α
 25 potencian el desarrollo de la memoria de las células T CD8⁺.

Ratones C57BL/6 recibieron ovoalbúmina restringida a clase I congénica (OVA) -Células T transgénicas del receptor de células T específicas de OT-I. Estos ratones se inmunizaron y se trataron con una sola aplicación de la proteína de fusión de IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α , IL2/IC que contiene 15,000 unidades de IL-2 o IL-2 recombinante (25,000 unidades). En los momentos indicados, la proporción relativa de células T OT-I dentro del compartimento de células T CD8⁺ total se evaluó en la sangre periférica.

10 Las Figuras 12A y 12B muestran el tipo de células de memoria OT-I persistentes soportadas por altas dosis de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α : (fig. 12A) Estrategia de regulación para identificar las células de memoria efectora (EM) y de memoria central (CM). (fig. 12B) Distribución de
15 células de memoria OT-1 28 y 202 días después de la inmunización para ratones que también recibieron IL-2/IL-2R α (12,000 unidades).

Las Figuras 13A y 13B muestran la caracterización de proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α de humano que contienen
20 enlaces de glicina/serina de longitud variable, como se muestra. (fig. 13A) Bioactividad IL-2 de IL-2/IL-2R α de humano purificada usando el bioensayo CTLL. (fig. 13B) Análisis de Western blot de proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α de humano después de SDS-PAGE bajo condiciones de
25 reducción.

La Figura 14 muestra la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α de humano unida a los anticuerpos anti-IL-2R α monoclonales. Las proteínas de fusión purificadas con los enlazadores indicados se incubaron primero con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2R α BC96, dirigido a la región de unión de ligando de IL-2R α humano o el anticuerpo monoclonal M-A257, dirigido a una región de unión sin ligando de IL-2R α de humano. La capacidad de BC96 o M-A257 para unirse a la superficie celular de IL-2R α se evaluó utilizando células CHO transfectadas con IL-2R α .

La Figura 15 muestra que IL-2 interactúa con el sitio de unión de IL-2 de IL-2R α en el contexto de proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α de humano. La bioactividad de IL-2 de las proteínas de fusión indicadas con enlazadores de glicina/serina variables se evaluó utilizando células CTLL. Mut se refiere a proteínas de fusión, en donde IL-2R α contenía mutaciones Arg³⁵ $\rightarrow$ Thr, Arg³⁶ $\rightarrow$ Ser. El análisis de inmunotransferencia confirmó cantidades similares de todas las proteínas de fusión (no mostradas).

Descripción Detallada de la Invención

Las presentes invenciones se describirán ahora más completamente con referencia a las figuras adjuntas, en las que se muestran algunas, pero no todas las modalidades de la invención. De hecho, estas invenciones pueden realizarse en muchas formas diferentes y no deben interpretarse como limitadas a las modalidades establecidas en el presente

documento; más bien, estas modalidades se proporcionan para que esta descripción satisfaga los requerimientos legales aplicables. Números iguales se refieren a elementos similares.

5 Muchas modificaciones y otras modalidades de las invenciones establecidas aquí vendrán a la mente a una persona experimentada en la técnica a la que pertenecen estas invenciones teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y las Figuras
10 asociadas. Por lo tanto, debe ser entendido que las invenciones no deben limitarse a las modalidades específicas descritas y que modificaciones y otras modalidades están previstas a ser incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean términos
15 específicos en el presente documento, se utilizan en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

I. Resumen

La tecnología actual se basa en el uso de interleucina-2 recombinante (IL-2), que tiene propiedades farmacológicas
20 pobres, en especial una corta semivida que limita su utilidad. Se proporcionan en este documento las proteínas de fusión de interleucina-2/receptor de interleucina-2 alfa (IL-2/IL-2R α) tienen propiedades intrínsecas que las separan de las proteínas de fusión IL-2 recombinante y otras IL-2. En
25 primer lugar, el tamaño de la proteína de fusión IL-2/IL-2R α

aumentará su semivida *in vivo*. En segundo lugar, la interacción débil entre la IL-2 e IL-2R α (una subunidad de la IL-2R) en el contexto de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α proporciona otro mecanismo para prolongar la disponibilidad
5 de la IL-2. Aunque no se está limitado al mecanismo específico de acción, la disponibilidad prolongada de la actividad de IL-2 se puede producir a través de una interacción competitiva entre el resto de IL-2 con IL-2R α de la fusión de IL-2/IL-2R α y con células que expresan la IL-2R.

10 *II. Proteínas de fusión de interleucina-2/receptor de interleucina-2 alfa*

Polinucleótidos que codifican las mismas

Se proporciona una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2) o una
15 variante funcional o fragmento de la misma fusionada en marco de lectura con un segundo polipéptido que comprende o que consiste en el dominio extracelular del polipéptido del receptor de interleucina-2 alfa (IL-2R α) o una variante funcional o fragmento del mismo.

20 Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión" se refiere a enlace genético en el marco de lectura de por lo menos dos polipéptidos heterólogos. Durante la transcripción/traducción, se hace una sola proteína. De esta manera, múltiples proteínas, o fragmentos de las mismas se
25 pueden incorporar en un solo polipéptido. "Unido

operativamente" está previsto que signifique un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operable entre dos polipéptidos fusiona ambos polipéptidos juntos dentro del marco de lectura para producir una proteína
5 de fusión de un polipéptido individual. En un aspecto particular, la proteína de fusión comprende además un tercer polipéptido que, como se discute en más detalle a continuación, puede comprender una secuencia de enlazador.

La proteína de fusión de IL-2/IL-2R α o la variante
10 activa o fragmento de la misma pueden tener una o más de las siguientes propiedades/actividades: (1) aumentar la actividad de las células T reguladoras (Tregs) y/o aumentar la tolerancia inmune en dosis bajas de terapias a base de IL-2; (2) aumentar la respuesta inmune y la memoria en terapias de
15 dosis más altas; (3) aumentar la disponibilidad de IL-2 en comparación con IL-2 recombinante; y/o (4) aumentar estimulación de IL-2 persistente de IL-2R que tiene linfocitos *in vivo*. Tal actividad y los métodos de prueba se describen con más detalle en este documento. Ver, por
20 ejemplo, el Ejemplo 1 proporcionado en el presente documento.

En una modalidad no limitante, un aumento de la actividad de Tregs que resulta de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α o la variante activa o fragmento de la misma se puede probar en una variedad de maneras, incluyendo, por
25 ejemplo, (1) una representación incrementada y el número de

Tregs en el compartimento de células T CD4⁺; (2) la
sobre regulación de CD25 dependiente de IL-2; (3) la
proliferación incrementada como se evaluó por la expresión
del marcador proliferativo Ki67; y (4) una fracción
5 incrementada del subconjunto Treg Klrp1⁺ terminalmente
diferenciada dependiente de IL-2. Tales efectos sobre Tregs
se pueden ver en, por ejemplo, en el bazo y el páncreas
inflamado.

En una modalidad no limitante, la proteína de fusión de
10 IL-2/IL-2R α o la variante activa o fragmento de la misma
aumenta Tregs supresores inmunes y tolerogénicos y la
inmunidad mediante el aumento de las respuestas T
efectoras/de memoria y, en otras modalidades, exhibe la
farmacocinética mejorada de transportar las respuestas en (1)
15 niveles eficaces inferiores de la actividad de IL-2 en
comparación con IL-2 nativa o recombinante; (2) muestra más
respuestas biológicas persistentes que IL-2 nativa o
recombinante; y/o (3) conserva la jerarquía con Tregs
sensible a dosis de nivel inferior que las células T
20 efectoras/de memoria.

En modalidades específicas, la proteína de fusión tiene
una actividad mejorada con respecto a la IL-2 nativa o
recombinante. Por ejemplo, el efecto de la proteína de fusión
de IL-2/IL-2R α puede aumentar las Tregs tolerogénicas en
25 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 disminuir el nivel de la actividad de IL-2 en comparación con IL-2 nativa o recombinante. En otras modalidades, la proteína de fusión de
5 IL-2/IL-2R α es más eficaz que la IL-2 nativa o recombinante en la inducción de aumento persistente de Tregs y propiedades relacionadas.

Varios fragmentos de IL-2 e IL-2R α y variantes de una variedad de organismo pueden utilizarse para generar las
10 proteínas de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-2R α se proporcionan en este documento. Tales componentes se discuten en mayor detalle en este documento. Los ejemplos de proteínas de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-2R α sin procesar no limitantes se establecen en las SEC ID NOs: 17, 19, 21,
15 23, 25, 27, 36, 38, 44, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, y 61, mientras que ejemplos no limitativos de formas maduras de las proteínas de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-R α se establecen en las SEC ID NOS: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 37, 39, 43, 45, 62 y 64. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos
20 que codifican tales proteínas de fusión se establecen en las SEC ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 47, 48, 49, 63 y 65.

El término "secuencia de señal secretora" indica una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como un componente de un polipéptido
25 mayor, dirige el polipéptido mayor a través de una vía

secretora de la célula en la que se sintetiza. El polipéptido mayor es comúnmente escindido 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 de fusión o polipéptido comprende la forma procesada del polipéptido que ha tenido el péptido secretor eliminado. Tal como se usa en el presente documento, la forma "no procesada" de la proteína de fusión conserva la secuencia del péptido secretor.

10 También se proporcionan fragmentos biológicamente activos y variantes de la forma madura y sin procesar de las proteínas de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-R α , y el polinucleótido que codifica las mismas. Tal fragmento de polipéptido funcional puede comprender por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o aminoácidos más continuos de una cualquiera de las SEC ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, o 64.

20 Alternativamente, una variante de polipéptido funcional puede comprender por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en las SEC ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, o 64.

25

Además se proporcionan variantes activas y fragmentos de polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-R α . Tal polinucleótido puede comprender por lo menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1100, 1200, 1300, 1500, 1800, 2000 nucleótidos contiguos de las SEC ID NOS: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 47, 48, 49, 63 o 65 o el polinucleótido que codifica los polipéptidos establecidos en las SEC ID NOS: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, o 64 y continuas para codificar una proteína de fusión del dominio extracelular de IL-2/IL-R α funcional. Alternativamente, un polinucleótido funcional puede comprender por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en las SEC ID NOS: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 47, 48, 49, 63 o 65 o el polinucleótido que codifica los polipéptidos establecidos en las SEC ID NOS: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, o 64 y continuas para codificar las proteínas de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-R α funcional.

Se reconoce, además, que los componentes de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se pueden encontrar cualquier orden. En una modalidad, el polipéptido de IL-2 se encuentra en el extremo N-terminal y el dominio extracelular de IL-2R α está

en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.

i. Interleucina-2

Como se usa en este documento, "interleucina-2" o "IL-2" se refiere a cualquier IL-2 nativa 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 lo contrario. El término abarca IL-2 no procesada, así como, cualquier forma de IL-2 que resulta de procesamiento en la célula (es decir, la forma madura de IL-2). El término también abarca variantes de origen natural y fragmentos de IL-2, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas, y variantes de origen no natural. La secuencia de aminoácidos de una forma madura ejemplar de la IL-2 (que tiene la secuencia de señal de 20 aminoácidos) se muestra en la SEC ID NO: 2. IL-2 humana no procesada comprende adicionalmente un péptido señal de 20 aminoácidos N-terminal (SEC ID NO: 1), que está ausente en la molécula madura de IL-2. La secuencia de aminoácidos de una forma madura ejemplar de IL-2 de ratón (que tiene la secuencia señal de 20 aminoácidos) se muestra en la SEC ID NO: 4. IL-2 de ratón sin procesar comprende adicionalmente un péptido señal de 20 amino ácidos N-terminal (SEC ID NO: 3), que está ausente en la molécula de IL-2 madura. Ver también las figuras 2A y 2B. Por una "IL-2 nativa", también

denominada "IL-2 tipo silvestre", se entiende una IL-2 recombinante o de origen natural.

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos adicionales para IL-2 son conocidas. Ver, por ejemplo, los
5 números de acceso de GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (mono nocturno)); Q7JFM5 (*Aotus nancymae* (mono nocturno de Nancy Ma)); P05016 (*Bos taurus* (bovino)); Q29416 (*Canis familiaris* (perro) (*Canis lupus familiaris*)); P36835 (*Capra hircus* (cabra)); y, P37997 (*Equus caballus* (caballo)).

10 También se proporcionan fragmentos biológicamente activos y variantes de IL-2. Tales variantes activas o fragmentos de IL-2 conservarán la actividad de IL-2. La frase "actividad biológica de IL-2" se refiere a una o más de las actividades biológicas de IL-2, incluyendo, pero no limitado
15 a, la capacidad de estimular los linfocitos que portan el receptor de IL-2. Tal actividad se puede medir tanto *in vitro* como *in vivo*. IL-2 es un regulador global de la actividad inmune y los efectos observados aquí son la suma de tales actividades. Por ejemplo, se regula la actividad de
20 supervivencia (Bcl-2), induce la actividad efectora T (IFN-gamma, Granzima B y perforina), y promueve la actividad reguladora T (FoxP3). Ver, por ejemplo, Malek et al. (2010) *Immunity* 33 (2): 153-65, incorporada aquí por referencia en su totalidad.

25 Variantes biológicamente activas se conocen de IL-2.

Véase, por ejemplo, Publicaciones de solicitud Estadounidense 20060269515 y 20060160187 y WO 99/60128, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia.

Los fragmentos biológicamente activos y variantes de IL-
5 2 se pueden emplear en las proteínas de fusión descritas en este documento. Tal fragmento funcional puede comprender por lo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150 o más aminoácidos continuos de las SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 4. Alternativamente, una variante
10 funcional puede comprender por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en las SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 4.

Se proporcionan además variantes activas y fragmentos de
15 polinucleótidos que codifican las proteínas de IL-2. Tal polinucleótido puede comprender por lo menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 nucleótidos contiguos de polipéptido que codifican las SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 4, y continuas para codificar una proteína que tiene la actividad IL-2.
20 Alternativamente, un polinucleótido funcional puede comprender por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con el polipéptido que codifica la secuencia amino establecida en las SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 4 y continuas para codificar un
25 polipéptido de IL-2 funcional

ii. Receptor de interleucina-2 alfa

El término "CD25" o "receptor de IL-2 α " o "IL-2R α " como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier IL-2R α 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 menos que se indique lo contrario. El término también abarca variantes de origen natural de IL-2R α , por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas o variantes de origen no natural. La IL-2 humana ejerce sus efectos biológicos a través de la señalización a través de su sistema receptor, IL-2R. IL-2 y su receptor (IL-2R) son necesarios para la proliferación de células T y otras funciones fundamentales que son cruciales de la respuesta inmune. IL-2R consiste de 3 proteínas transmembrana de tipo I unidas no covalentemente que son las cadenas alfa (p55), beta (p75), y gamma (p65). La cadena alfa del IL-2R de 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- α) se puede emplear en la fusión de proteínas descritas en el presente documento.

La secuencia de aminoácidos de una forma madura ejemplar del IL-2R α de humano se muestra en la SEC ID NO: 6. IL-2R α de

humano sin procesar se muestra en la SEC ID NO: 5. El dominio extracelular de la SEC ID NO: 6 se establece en la SEC ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de una forma madura ejemplar de IL-2R α de ratón se muestra en la SEC ID NO: 9. La IL-2R α de ratón sin procesar se muestra en la SEC ID NO: 8. El dominio extracelular de la SEC ID NO: 9 se establece en la SEC ID NO: 10. Por un "IL-2R α nativo", también denominado "IL-2R α de tipo silvestre", se entiende un IL-2R α de origen natural o recombinante. La secuencia de una molécula de IL-2R α humano nativa se muestra en las SEC ID NOs: 5 y 6.

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para IL-2R α son conocidas. Ver, por ejemplo, los números de acceso 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*), cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia.

También se proporcionan fragmentos biológicamente activos y variantes del dominio extracelular de IL-2R α . Tales variantes activas o fragmentos del dominio extracelular de IL-2R α conservarán la actividad del dominio extracelular de IL-2R α . La frase "Actividad biológica del dominio extracelular de IL-2R α " se refiere a una o más de las actividades biológicas de dominio extracelular de IL-2R α , incluyendo, pero no limitado a, la capacidad de mejorar la

señalización intracelular en las células sensibles al receptor de IL-2. Ejemplos no limitantes de fragmentos biológicamente activos y variantes del IL-2R α se describen, por ejemplo, en Robb et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 5 85:5654-5658, 1988, que se incorpora aquí por referencia.

Fragmentos biológicamente activos y variantes del dominio extracelular de IL-2R α se pueden emplear en las proteínas de fusión descritas en este documento. Tal fragmento funcional puede comprender por lo menos 10, 11, 10 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 215 o mayores amino ácidos continuos del dominio extracelular de cualquiera de las SEC ID NOs: 6, 9, 7, 10, 5, u 8. Alternativamente, una variante funcional puede comprender por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 15 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia establecida en las SEC ID NOs: 6, 9, 7, 10, 5 u 8.

En una modalidad, las proteínas de fusión proporcionadas en este documento pueden comprender por lo menos una mutación 20 en el dominio extracelular de IL-2R α . En una modalidad específica, la arginina en la posición 35 del IL-2R α se puede mutar a una Treonina y/o Arginina en la posición 36 del IL-2R α se puede mutar a una serina. Tal proteína de fusión puede haber aumentado la actividad de IL-2 en comparación con una 25 proteína de fusión que no comprende estas mutaciones en el

dominio extracelular de IL-2R α y/o en comparación con la IL-2 nativa o recombinante. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión ejemplares que comprenden IL-2R α con mutaciones dentro del dominio extracelular de IL-2R α se establecen en las SEC ID NOS: 62 y 64. En una modalidad, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS: 62 o 64; o una secuencia que tiene por lo menos 80%, 85%, 90%, o 95% a cualquiera de las SEC ID NOS: 62 o 64.

Se proporcionan además variantes activas y fragmentos de polinucleótidos que codifican el dominio extracelular de IL-2R α . Tal polinucleótido puede comprender por lo menos 100, 200, 300, 400, 500, 600 o mayores nucleótidos continuos que codifican el polipéptido de las SEC ID NOS: 6, 9, 1, 10, 5, o 8 y continuas para codificar una proteína que tiene la actividad del dominio extracelular de IL-2R α . Alternativamente, un polinucleótido funcional puede comprender por lo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con el polipéptido que codifica la secuencia amino establecida en las SEC ID NO: 6, 9, 1, 10, 5, o 8 y continuas para codificar una proteína que tiene la actividad del dominio extracelular de IL-2R α .

iii. Componentes Adicionales

Las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α pueden comprender además elementos adicionales. Tales 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 la purificación más eficiente de la proteína, y/o modular la actividad de la proteína de fusión.

“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 se pueden originar del mismo organismo como los otros componentes de polipéptido de la proteína de fusión, o los componentes adicionales pueden ser de un organismo diferente que los otros componentes de polipéptido de la proteína de fusión.

En una modalidad, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α comprende una secuencia de unión situada entre el polipéptido de IL-2 y el polipéptido de IL-2R α . El enlazador puede ser de cualquier longitud y puede comprender por lo 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. En una modalidad, la secuencia de enlazador comprende residuos de aminoácidos de glicina. En otros casos, la secuencia de enlazador comprende una combinación de

residuos de glicina y aminoácidos de serina. Tales enlazadores de glicina/serina pueden comprender cualquier combinación de los residuos de aminoácidos, incluyendo, pero no limitado a, 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 de enlazador pueden comprender GGGSGGGSGGGS (SEC ID NO: 13) (también indicada como $(\text{Gly}_3\text{Ser})_3$); GGGSGGGSGGGSGGGS (SEC ID NO: 11) (también indicada como $(\text{Gly}_3\text{Ser})_4$); o $(\text{Gly}_3\text{Ser})_5$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_6$; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_7$, etc. Las secuencias de enlazador pueden comprender además $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ como se establece en la SEC ID NO: 50; GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 40) (también indicado como $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 41) (también indicado como $(\text{Gly}_4\text{Ser})_5$); $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_6$; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_7$; $(\text{Gly}_4\text{Ser})_8$, etc. Además, las variantes activas y fragmentos de cualquier enlazador además pueden ser empleados en la proteína de fusión descrita en este documento.

Se reconoce, además, que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α puede comprender elementos adicionales que ayudan en la traducción de la proteína de fusión. Tales secuencias incluyen, por ejemplo, secuencias de Kozak unidas al extremo 5' del polinucleótido que codifica la proteína de fusión. La secuencia de consenso Kozak es una secuencia que se produce en ARNm eucariótico que

juega un papel en la iniciación del proceso de traducción y tiene el consenso (gcc)gccRccAUGG (SEC ID NO: 35); en donde (1) una letra minúscula indica la base más común en una posición en donde la base sin embargo puede variar; (2) las 5 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 de IUPAC 'R' que indica que una purina (adenina o guanina) es normalmente observada en esta posición; y (3) la secuencia 10 entre paréntesis ((gcc)) es de significado incierto. En una modalidad, la secuencia de Kozak comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO: 53.

En una modalidad no limitante, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α comprende una secuencia de Kozak optimizada líder 15 de IL-2 como se establece en la SEC ID NO: 28 o una variante funcional o fragmento de la misma. Una variante funcional o fragmento de una secuencia Kozak conservará la capacidad de aumentar la traducción de la proteína cuando se compara con el nivel de la traducción de una secuencia que carece del 20 líder. Tal fragmento funcional puede comprender por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 nucleótidos continuos de una secuencia de Kozak o la secuencia establecida en la SEC ID NO: 28 o 53. Alternativamente, una variante funcional puede comprender por 25 lo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia Kozak o la secuencia establecida en la SEC ID NO: 28 o 53.

En todavía otras modalidades, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α comprende una o más etiquetas en el extremo C-terminal para ayudar en la purificación del polipéptido.

Tales etiquetas son conocidas e incluyen, por ejemplo, una etiqueta de histidina. En modalidades específicas una etiqueta 6X His es empleada. Se reconoce además que una secuencia de enlazador adicional se puede emplear entre la proteína de fusión y la etiqueta His.

Una modalidad no limitante de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se establece en la FIG. 1, FIGS. 2A, y 2B. Tal proteína de fusión comprende un péptido líder, IL-2 o una variante funcional o fragmento del mismo, un enlace variable, IL-2R α , un enlace de glicina, etiqueta 6x His, y dos codones de terminación.

iv. Variantes y fragmentos

a. Polinucleótidos

Los fragmentos y variantes de los polinucleótidos que codifican la proteína de fusión de dominio extracelular de IL-2/IL-2R α o los diversos componentes contenidos en el mismo (es decir, el dominio extracelular de IL-2R α , los polipéptidos de IL-2R α , las secuencias de enlace y/o secuencias de Kozak) se pueden emplear en los diversos métodos y composiciones de la invención. Por "fragmento" se

entiende una porción del polinucleótido y por lo tanto la proteína codificada de ese modo 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 tiene actividad IL-2, la actividad del dominio extracelular de IL-2R α , actividad de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α , o si codifica una secuencia de enlazador, proporciona la actividad deseada de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α .

Una porción biológicamente activa de un dominio extracelular de IL-2R α , polipéptido IL-2, proteína de fusión IL-2/IL-2R α , secuencia de Kozak, o secuencia de enlazador se pueden preparar por aislamiento de una porción de uno de los polinucleótidos que codifican la porción del dominio extracelular de IL-2R α o polipéptido de IL-2 y la expresión de la porción codificada del polipéptido (por ejemplo, por expresión recombinante *in vitro*), y evaluando la actividad de la porción del dominio extracelular de IL-2R α o/y polipéptido de IL-2 o la actividad de la proteína de fusión de IL-2/ILR α .

Las secuencias "variantes" tienen un alto grado de similitud de secuencias. Para los polinucleótidos, variantes conservadoras incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de dominio extracelular de IL-2R α , polipéptidos de IL-2, proteínas de

fusión de IL-2/IL-2R α , o secuencias de enlazador. Las variantes como éstas se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación. Polinucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio pero que aún codifica un dominio extracelular de IL-2R α , un polipéptido de IL-2, proteína de fusión de IL-2/IL-2R α , una secuencia de Kozak, o la secuencia de enlazador.

b. Polipéptidos

Por proteína "variante" está prevista una proteína derivada de la proteína nativa por supresión (llamada truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína nativa; 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 en la proteína nativa. Las proteínas variantes son biológicamente activas, es decir continúan poseyendo la actividad biológica deseada, es decir, actividad de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α , la actividad de IL-2 o la actividad del dominio extracelular de IL-2R α . Tales variantes pueden resultar de, por ejemplo, polimorfismo genético o de manipulación humana. Las variantes

biológicamente activas de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α o cualquiera de sus componentes (es decir, un polipéptido de dominio extracelular de IL-2R α , un polipéptido de IL-2, o una secuencia de enlazador) tendrá por lo menos
5 aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% , 98%, 99% o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la proteína nativa como es determinado por los programas y parámetros alineación de secuencias descritos en otra parte
10 de este documento. Una variante biológicamente activa de una proteína puede diferir de la proteína por tan pocos como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 -10, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

15 Las proteínas se pueden alterar de varias maneras incluyendo sustituciones, supresiones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, variantes de secuencia de aminoácidos del dominio
20 extracelular de IL-2R α , polipéptido de IL-2, proteína de fusión de IL-2/IL-2R α , o secuencias de enlace se pueden preparar por mutaciones en el ADN. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985)
25 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492; Kunkel et al. (1987)

Methods in Enzymol 154: 367-382; Patente Estadounidense No. 4,873,192; Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York) y las referencias citadas en la misma. Las directrices en
5 cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Strcuture (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC), incorporada aquí como referencia. Las
10 sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tiene propiedades similares, pueden ser preferibles.

Por lo tanto, los polinucleótidos descritos en este documento pueden incluir las secuencias de origen natural,
15 las secuencias "nativas", así como formas mutantes. Del mismo modo, las proteínas utilizadas en los métodos de la invención abarcan proteínas de origen natural, así como variaciones y formas modificadas de los mismos. Tales variantes continuarán poseyendo la capacidad de implementar un evento de
20 recombinación. Generalmente, las mutaciones realizadas en el polinucleótido que codifica el polipéptido variante no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura, y/o crear regiones complementarias que podrían producir la estructura de ARNm secundaria. Ver, la Publicación de Solicitud de
25 Patente EP No. 75,444.

Las variantes de polinucleótidos y proteínas también abarcan secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y recombinogénico como transposición de secuencias de ADN. Con tal procedimiento, uno o más diferentes dominios

5 extracelulares de IL-2R α o secuencias de codificación de IL-2 pueden ser manipulados para crear un nuevo dominio extracelular de IL-2R α o polipéptidos de IL-2 que poseen las propiedades deseadas. De esta manera, las bibliotecas de polinucleótidos recombinantes se generan a partir de una

10 población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que tienen una identidad de secuencia sustancial y se pueden recombinar homológamente *in vitro* o *in vivo*. Las estrategias para tal transposición de secuencias de ADN son conocidas en la técnica. Ver, por

15 ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370: 389-391; Cramer 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; Cramer et al. (1998) Nature

20 391:288-291; y las patentes Estadounidenses Nos. 5,605,793 y 5,837,458.

III. Polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α y métodos de fabricación

Las composiciones incluyen adicionalmente

25 polinucleótidos aislados que codifican las diversas proteínas

de fusión descritas anteriormente en este documento, y variantes y fragmentos de las mismas. Se describen además vectores y casetes de expresión que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento. Los
5 casetes de expresión incluirán generalmente un promotor unido operativamente a un polinucleótido y una región de terminación transcripcional y traduccional.

El uso del término "polinucleótido" no está previsto que limite la presente invención a polinucleótidos que comprenden
10 ADN. Las personas experimentadas en la técnica reconocerán que los polinucleótidos, pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas de origen natural y análogos sintéticos.

15 Un polinucleótido o proteína "aislada" o "purificada", o porción biológicamente activa de la misma, es sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su entorno natural. Por lo tanto, un
20 polinucleótido o proteína aislado o purificado está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. De
25 manera óptima, un polinucleótido "aislado" está libre de

secuencias (óptimamente secuencias de codificación de proteína) que flanquean de forma natural el polinucleótido (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo a partir del cual el polinucleótido es derivado. Por ejemplo, en diversas modalidades, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de la secuencia de nucleótidos que flanquean de forma natural el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, o 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la invención o una porción biológicamente activa de la misma se produce recombinantemente, de forma óptima el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, o 1% (en peso seco) de los precursores químicos o químicos sin proteína de interés.

La biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica se pueden emplear en el presente documento. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology"

Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & 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).

También se proporciona en el presente documento 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 expresión (por ejemplo, un promotor) cuando los controles de secuencia de control de expresión y regula la transcripción y traducción de esa secuencia. El término "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 es expresada y mantiene el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia bajo el control de la secuencia de control de 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, tal señal de inicio puede insertarse frente al gen. Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al cual otro segmento de ácido nucleico puede estar
5 unido de manera que se produzca la replicación del segmento unido. El promotor puede ser, o es idéntico a, un promotor de bacteria, levadura, insecto o mamífero. Además, el vector puede ser un plásmido, cósmido, cromosoma artificial de levadura (YAC), un bacteriófago o ADN viral eucariótico.

10 Se pueden emplear otras numerosas estructuras de vectores conocidas en la técnica como útiles para expresar la proteína. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a: adenovirus, virus de simio 40 (SV40), citomegalovirus (CMV), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus de la leucemia
15 murina de Moloney, sistemas de administración de ADN, es decir liposomas, y sistemas de administración de plásmido de expresión. Además, una clase de vectores comprende elementos de ADN derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino, virus de polioma, baculovirus, retrovirus o virus
20 Semliki Forest. Tales vectores pueden obtenerse comercialmente o ensamblarse a partir de las secuencias descritas por métodos bien conocidos en la técnica.

Se proporciona en este documento un sistema de vector hospedero para la producción de un polipéptido que comprende
25 el vector de una célula hospedera apropiada. Las células

hospederas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, células procarióticas o eucarióticas, por ejemplo células bacterianas (incluyendo células Grampositivas), células de levadura, células fúngicas, células de insectos y células de animales.

5 Numerosas células de mamífero se pueden utilizar como hospederos, incluyendo, pero no limitado a, la célula de fibroblastos de ratón NIH 3T3, células CHO, células HeLa, células Ltk⁻, etc. Células animales adicionales, tales como R1.1, B-W y células L-M, células de riñón de mono verde
10 africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insecto (por ejemplo, sfq), y células humanas y células vegetales en cultivo de tejidos pueden también ser utilizadas.

Una amplia variedad de combinaciones de vector
15 hospedero/expresión puede emplearse en la expresión de las secuencias de polinucleótidos que aquí se presentan. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores apropiados incluyen derivados de
20 SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de *E. coli* col El, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN del fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago λ , por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago de
25 una sola cadena filamentosa; plásmidos de levadura tales como

el plásmido 2 μ o derivados de los mismos; vectores útiles en células eucarióticas, tales como vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que han
5 sido modificados para emplear el ADN de fago u otras secuencias de control de expresión; y similares.

Cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión (secuencias que controlan la expresión de una secuencia de nucleótidos unida operativamente a ella)
10 puede utilizarse en estos vectores para expresar las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento. Tales secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema lac, el
15 sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el sistema LTR, el operador principal y las regiones promotoras de fago λ , las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (por
20 ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de apareamiento tipo α de levadura, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

25 Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de

control de expresión y los hospederos funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento. No todos los hospederos funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, una persona experimentada en la técnica será capaz de seleccionar los vectores apropiados, secuencias de control de expresión, y los hospederos sin excesiva experimentación para llevar a cabo la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta invención. Por ejemplo, en la selección de un vector, el hospedero debe ser considerado porque el vector debe funcionar en él. El número de copia del vector, la capacidad de controlar el número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores de antibióticos, también se considerarán.

En la selección de una secuencia de control de expresión, normalmente se considerarán una diversidad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia de nucleótidos particular o gen para ser expresado, particularmente en lo relativo a las estructuras secundarias potenciales. Hospederos unicelulares apropiados serán seleccionados mediante la consideración de, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar proteínas correctamente,

y sus requerimientos de fermentación, así como la toxicidad para el hospedero del producto codificado por la secuencia de nucleótido a ser expresada, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

5 En la preparación del casete de expresión, los diversos polinucleótidos pueden ser manipulados, con el fin de proporcionar las secuencias de polinucleótidos en la orientación apropiada y, si es apropiado, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, se pueden emplear
10 adaptadores o enlaces para unir los polinucleótidos u otras manipulaciones pueden estar involucrados para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminación de ADN superfluo, eliminación de sitios de restricción, o similares. Por ejemplo, los enlazadores tales como dos glicinas pueden
15 añadirse entre los polipéptidos. Los residuos de metionina codificadas por las secuencias de nucleótidos atg se pueden añadir para permitir la iniciación de la transcripción génica. Para este propósito, la mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, restricción, hibridación,
20 resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones, pueden estar involucrados.

Además se proporciona un método para producir un polipéptido que comprende expresar un polinucleótido que codifica una proteína de fusión descrita en este documento en
25 una célula hospedera bajo condiciones apropiadas que permiten

la producción del polipéptido y recuperación del polipéptido producido de este modo.

IV. Métodos de uso

Se proporcionan varios métodos para modular una
5 respuesta inmune.

Tal como se utiliza aquí, el término "modular" incluye inducir, inhibir, potenciar, elevar, aumentar o disminuir una actividad o respuesta dada.

Por "sujeto" se entiende mamíferos, por ejemplo,
10 primates, seres humanos, animales domésticos y agrícolas, tales como, pero no limitado a, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, y similares. En una modalidad, el sujeto sometido a tratamiento con las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en este documento es un humano.

15 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se refiere a la cantidad de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α suficiente para provocar una respuesta biológica deseada. Como se apreciará por una persona experimentada en la técnica, la cantidad absoluta de
20 una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α particular que es eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α a ser suministrada, la célula o tejido objetivo, y similares. Una persona experimentada en la técnica entenderá
25 además que una cantidad eficaz se puede administrar 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).

i. Métodos para aumentar una respuesta inmune

5 Se proporcionan varios métodos para aumentar la respuesta inmune en un sujeto. Tales métodos comprenden administrar a un sujeto en necesidad de un aumento en la respuesta inmune de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α . Como tal, en
10 modalidades específicas, la aplicación transitoria de dosis más altas de IL-2 se emplean para respuestas efectoras inmunes y de memoria reforzadas.

 Se reconoce además que las diversas proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α se puede utilizar en combinación con un
15 antígeno para aumentar la respuesta inmune al antígeno. Por lo tanto, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α también se puede utilizar como un adyuvante de vacuna, especialmente para mejorar la memoria inmune mediada por células reforzadas.

20 Por ejemplo, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se puede utilizar para mejorar una preparación de vacuna. Por lo tanto, las diferentes proteínas de fusión de IL-2 IL-2R α son útiles para aumentar la eficacia de las vacunas contra el cáncer o para vacunas que son poco inmunogénicas. Se
25 proporcionan además métodos para aumentar la eficacia o la

inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto, o la superación de una respuesta inmune suprimida a una vacuna en un sujeto, incluyendo (i) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-
5 2R α y (ii) administrar al sujeto una vacuna.

Por "vacuna" se entiende una composición útil para estimular una respuesta inmune específica (o respuesta inmunogénica) en un sujeto. En algunas modalidades, la respuesta inmunogénica es protectora o proporciona
10 inmunidad protectora. Por ejemplo, en el caso de un organismo causante de la enfermedad de la vacuna permite al sujeto resistir mejor la infección con o progresión de la enfermedad del organismo contra el que se dirige la vacuna. Alternativamente, en el caso de un cáncer, la vacuna
15 refuerza las defensas naturales del sujeto contra el cáncer que ya se ha desarrollado. Estos tipos de vacunas también pueden impedir que el mayor crecimiento de los cánceres existentes, prevenir la recurrencia de cáncer que se tratan, y/o eliminar las células cancerosas no muertas por
20 los tratamientos previos.

Las vacunas representativas incluyen, pero no se limitan a, las vacunas contra la difteria, tétanos, tosferina, poliomiелitis, sarampión, paperas, rubéola, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b, varicela, meningitis, virus de
25 la inmunodeficiencia humana, tuberculosis, virus de Epstein

Barr, paludismo, hepatitis E, dengue, rotavirus, herpes, virus del papiloma humano y cáncer. Las vacunas de interés incluyen las dos vacunas que han sido autorizadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos para
5 prevenir las infecciones de virus que pueden conducir al cáncer: la vacuna contra la hepatitis B, que previene la infección por el virus de la hepatitis B, un agente infeccioso asociado con el cáncer de hígado (MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 46: 107-09, 1997); y Gardasil™, que
10 previene la infección con los dos tipos de virus del papiloma humano que en conjunto causan el 70 por ciento de los casos de cáncer de cuello uterino en todo el mundo (Speck and Tyring, Skin Therapy Lett. 11: 1-3, 2006). Otras vacunas de tratamiento de interés como vacunas terapéuticas para el
15 tratamiento del cáncer, cáncer cervical, linfoma de células foliculares B no Hodgkin, cáncer de riñón, melanoma cutáneo, melanoma ocular, cáncer de próstata y mieloma múltiple.

Por "mejoramiento de la eficacia" o "mejoramiento de la inmunogenicidad" con respecto a una vacuna se pretende
20 mejorar un resultado, por ejemplo, tal como se mide por un cambio en un valor específico, tal como un aumento o una disminución de un parámetro particular de una actividad de una vacuna asociada con la inmunidad protectora. En una modalidad, el mejoramiento se refiere a por lo menos un 5%,
25 10%, 25%, 50%, 100% o un aumento superior al 100% en un

parámetro particular. En otra modalidad, el mejoramiento se refiere a por lo menos una disminución de 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o mayor que 100% en un parámetro particular. En un ejemplo, el mejoramiento 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 por lo menos un aumento de 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, o mayor que 100% de la eficacia de la vacuna para ese propósito. En un ejemplo adicional, el mejoramiento 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 el cáncer que ya se ha desarrollado, tal como por lo menos un aumento de 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, o mayor al 100% en la eficacia de la vacuna para ese propósito.

Del mismo modo, por "superar una respuesta inmune suprimida" con respecto a una vacuna se pretende mejorar un resultado, por ejemplo, tal como se mide por un cambio en un valor específico, tal como un retorno a un valor anteriormente positivo en un parámetro particular de una actividad de una vacuna asociada con la inmunidad protectora. En una modalidad, superación refiere a por lo menos 5%, 10%, 25%, 50%, 100% o un aumento superior al 100% en un parámetro particular. En un ejemplo, la superación de una respuesta inmune suprimida a una vacuna se refiere a una renovada

capacidad de la vacuna para inhibir o tratar la progresión de la enfermedad, tal como por lo menos una renovación de 5%, 10%, 25%, 50%, 100, o mayor que 100% en la eficacia de la vacuna para ese propósito. En un ejemplo adicional, la
5 superación de una respuesta inmune suprimida a una vacuna se refiere a una renovada capacidad de la vacuna para reclutar las defensas naturales del sujeto contra el cáncer que ya se ha desarrollado, tales como por lo menos una renovación de 25%, 50%, 100%, o mayor de 100% en la eficacia de la vacuna
10 para ese propósito.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que es útil en el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o condición. Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de
15 una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α es una cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para lograr un efecto deseado, tal como la modulación de una respuesta inmune en un sujeto sin causar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. Como se indicó anteriormente, una
20 cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se puede administrar a un sujeto para aumentar una respuesta inmune, mejorar la respuesta inmune a un antígeno, mejorar la eficacia o la inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto, o para superar una respuesta inmune
25 suprimida a una vacuna. La cantidad eficaz de una proteína de

fusión de IL-2/IL-2R α útil para modular las funciones dependerá del sujeto a ser tratado, la gravedad de la afección, y la forma de administración de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α . Las dosis ejemplares incluyen

5 aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^7 IU de actividad de IL-2 por adulto, aproximadamente 10^4 a 10^5 IU de actividad de IL-2 por adulto, aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto, aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 IU de la actividad de IL-2 por adulto. En

10 otros casos, la dosis terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α es de aproximadamente 10^5 IU de la actividad de IL-2 $\pm$ 100 veces, es de aproximadamente 10^5 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 10 veces, aproximadamente 10^5 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 2 veces, aproximadamente 10^5 IU de

15 actividad de IL-2 $\pm$ 20 veces, aproximadamente 10^5 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 30 veces, aproximadamente 10^5 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 40 veces, aproximadamente 10^5 IU de la actividad de IL-2 $\pm$ 50 veces, aproximadamente 10^5 IU de la actividad de IL-2 $\pm$ 60 veces, aproximadamente 10^5 IU de la

20 actividad de IL-2 $\pm$ 70 veces, aproximadamente 10^5 IU de la actividad de IL-2 $\pm$ 80 veces, o aproximadamente 10^5 IU de la actividad de IL-2 $\pm$ 90 veces. En una modalidad específica no limitante, una proteína de fusión IL-2 humana se administra en esta dosis.

25 En una modalidad, el estándar de referencia para la

proteína de fusión de IL-2 de ratón es la IL-2 de ratón es de eBiosciences (Número de Catálogo: 14-8021). En pocas palabras, la bioactividad de la IL-2 de ratón de eBioscience es como sigue: La ED50 de esta proteína, como se mide por el
5 ensayo de proliferación de células CTLL-2, es menor que o igual a 175 pg/mL. Esto corresponde a una actividad específica de más de o igual a 5.7×10^6 Unidades/mg.

En otra modalidad, el estándar de referencia para la proteína de fusión de IL-2 humana es el fármaco de IL-2
10 humana de Aldesleukina (Proleukin). Por lo tanto, las proteínas de fusión de IL-2 descritas en este documento están directamente comparadas con la proteína de fusión con el fármaco de IL-2 que se utiliza en dosis baja o alta dosis de la terapia con IL-2. La actividad de IL-2 para IL-2 de ratón
15 y de humano utilizan el mismo ensayo y su actividad en unidades/mg son similares. Con respecto al fármaco de IL-2 humana, es decir, aldesleukina (Proleukin), la medida estándar de una cantidad de IL-2 es la unidad internacional (IU), que técnicamente no es una cantidad fija, pero la
20 cantidad que produce un efecto fijo en un ensayo específico de la actividad biológica, es decir, ensayo de proliferación de CTLL. En la práctica, la fabricación de IL-2 ha sido estandarizada y hay una conversión entre el peso de fármaco y unidades internacionales. Es 1.1 mg de IL-2 = 18 millones de
25 IU (abreviado 18 MIU).

Se entiende además que las dosis apropiadas de un agente funcional dependen de la potencia del agente activo con respecto a la actividad a ser modulada. Tales dosis apropiadas pueden determinarse usando los ensayos descritos
5 en el presente documento. Además, se entiende que el nivel de dosis específica para cualquier sujeto animal particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el tiempo de
10 administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, y/o cualquier combinación de fármacos.

Cuando la administración es con el propósito de tratamiento, la administración puede ser, ya sea para un propósito profiláctico o terapéutico. Cuando se proporciona
15 profilácticamente, la sustancia se proporciona antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la sustancia sirve para prevenir o atenuar cualquier síntoma posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la sustancia se proporciona en (o poco después) la aparición de
20 un síntoma. La administración terapéutica de la sustancia sirve para atenuar cualquier síntoma real.

La persona experimentada en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar efectivamente un sujeto, incluyendo, pero no limitado
25 a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos

previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α puede incluir un solo tratamiento o, 5 preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosificación eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α utilizada para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden 10 resultar y ser evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe aquí.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se pueden determinar mediante estudios con animales. Cuando se utilizan ensayos con 15 animales, se administra una dosis para proporcionar una concentración *in vivo* objetivo similar a la que se ha demostrado ser eficaz en los ensayos de animales.

ii. Métodos para disminuir una respuesta inmune

Se proporcionan varios métodos para disminuir la 20 respuesta inmune en un sujeto. Tales métodos comprenden administrar a un sujeto en necesidad de una disminución en la respuesta inmune de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α .

Hay mucho interés de aprovechar el poder de supresión de 25 Tregs para inhibir las respuestas inmunes no deseadas. Los

datos en el ratón y el hombre muestran que el mejoramiento de la señalización de IL-2R con una dosis baja de IL-2 aumenta selectivamente las Tregs y mejora los mecanismos tolerogénicos inmunes. Las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α proporcionadas en este documento representan una nueva y mejorada forma de IL-2 que mejora más potencialmente las Tregs. Por lo tanto, las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α se pueden administrar a pacientes con enfermedades autoinmunes, enfermedades crónicas del injerto contra el hospedero, reacciones de rechazo de trasplantes, y otras condiciones en donde el objetivo es suprimir la auto-reactividad.

Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α que promueve la tolerancia inmune puede encontrar uso, por ejemplo, en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio, incluyendo pero no limitado a, los rechazos de injertos y alergias. Por lo tanto, en una modalidad, se proporciona un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno autoinmune o inflamatorio. Tal método comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α .

Los ejemplos no limitantes de trastornos autoinmunes que pueden ser tratados o prevenidos incluyen diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad celíaca,

lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis sistémica, enfermedad del injerto contra hospedero, vasculitis inducida por HCV, alopecia areata o psoriasis.

5 Enfermedades autoinmunes adicionales incluyen aquellas en las que ya es una indicación de que las Tregs pueden debilitarse, y se beneficiarían del mejoramiento de las Tregs dependientes de IL-2. A este respecto, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en IL-2, IL-2R α , o IL-2R13 se han
10 asociado como un riesgo genético para la diabetes 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 se
15 relaciona con números y/o actividad de Treg deterioradas. Además, la terapia de IL-2 de bajas dosis ha mostrado beneficiar a los pacientes con GvHD crónica y vasculitis inducida por VHC. Por lo tanto, las poblaciones de estos pacientes también se pueden administrar una cantidad
20 terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α .

En otras modalidades, la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α se puede utilizar en combinación con un agente terapéutico para reducir la respuesta inmune al agente (es
25 decir, proteínas). Por ejemplo, la proteína de fusión de IL-

2/IL-2R α se puede utilizar en combinación con una proteína terapéutica que debe administrarse crónicamente a un sujeto. Por lo tanto, en una modalidad específica, el método comprende administrar al sujeto por lo menos un agente
5 terapéutico adicional en combinación con una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α . Tales agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, una citoquina, un glucocorticoide, una antraciclina (por ejemplo, doxorrubicina o epirubicina), una fluoroquinolona (por ejemplo, ciprofloxacina), un antifolato
10 (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,
15 flutamida), un antiestrógeno (por ejemplo, tamoxifeno), un compuesto de platino por ejemplo, cisplatino), un alcaloide de la vinca (por ejemplo, la vinorelbina, vinblastina o vindesina), o inhibidor mitótico (por ejemplo, paclitaxel o docetaxel).

20 Por otra parte, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α además se puede administrar en terapias de combinación para aumentar las Tregs y la tolerancia. Tales terapias de combinación pueden comprender la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína
25 de fusión de IL-2/IL-2R α en combinación con anti-TNF α u otros

agentes para inhibir las respuestas inflamatorias.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α útil para disminuir una respuesta inmune dependerá del sujeto que se es tratado, la gravedad de la afección, y la forma de administración de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α . Las dosis ejemplares incluyen aproximadamente 10^3 IU a aproximadamente 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto o aproximadamente 10^4 IU a aproximadamente 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto. Las dosis ejemplares incluyen aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto, aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 por adulto, aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto, aproximadamente 10^4 a 10^5 IU de actividad de IL-2 por adulto, o aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto. En otros casos, la dosis terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α es de aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 100 veces, es de aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 10 veces, aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 2 veces, aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 20 veces, aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 30 veces, aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 40 veces, aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 50 veces, aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 60 veces,

aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 70 veces,
aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 80 veces, o
aproximadamente 10^4 IU de actividad de IL-2 $\pm$ 90 veces. En
una modalidad específica no limitante, una proteína de fusión
5 de IL-2 humana se administra a esta dosis.

En una modalidad, el estándar de referencia para la
proteína de fusión de ratón de IL-2 es la IL-2 de ratón es de
eBiosciences (Número de Catálogo: 14-8021). En resumen, la
bioactividad de IL-2 de ratón de eBioscience es como sigue:
10 La ED50 de esta proteína, como se mide por el ensayo de
proliferación de células CTLL-2, es menor que o igual a 175
pg/mL. Esto corresponde a una actividad específica de más de
o igual a 5.7×10^6 unidades/mg.

En otra modalidad, el estándar de referencia para la
15 proteína de fusión de IL-2 humana es el fármaco de IL-2
humana Aldesleukina (Proleukin). Por lo tanto, las proteínas
de fusión de IL-2 descritas en este documento son
directamente comparadas con la proteína de fusión con el
fármaco de IL-2 que se utiliza en la terapia de IL-2 de dosis
20 baja o dosis alta. La actividad de IL-2 para IL-2 de ratón y
de humano utilizan el mismo ensayo y su actividad en
unidades/mg son similares. Con respecto al fármaco de IL-2
humana, es decir, aldesleukina (Proleukin), la medida
estándar de una cantidad de IL-2 es la unidad internacional
25 (IU), que técnicamente no es una cantidad fija, pero la

cantidad que produce un efecto fijo en un ensayo específico de la actividad biológica, es decir, ensayo de proliferación de CTLL. En la práctica, la fabricación de IL-2 ha sido estandarizada y hay una conversión entre el peso de fármaco y
5 las unidades internacionales. Esto es 1.1 mg de IL-2 = 18 millones de IU (abreviado 18 MIU).

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 a ser modulada. Tales
10 dosis apropiadas pueden determinarse usando los ensayos descritos en el presente documento. Además, se entiende que el nivel de dosis específica para cualquier sujeto animal particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso
15 corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, y/o cualquier combinación de fármacos.

Cuando la administración es con el propósito de tratamiento, la administración puede ser, ya sea para un
20 propósito profiláctico o terapéutico. Cuando se proporciona profilácticamente, la sustancia se proporciona antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la sustancia sirve para prevenir o atenuar cualquier síntoma posterior. Cuando se
25 proporciona terapéuticamente, la sustancia se proporciona

en (o poco después) la aparición de un síntoma. La administración terapéutica de la sustancia sirve para atenuar cualquier síntoma real.

La persona experimentada en la técnica apreciará que
5 ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar efectivamente un sujeto, incluyendo, pero no limitado a la severidad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto
10 con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α puede incluir un solo tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosificación eficaz de una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α utilizada para el
15 tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden resultar y ser evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe aquí.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de una proteína
20 de fusión de IL-2/IL-2R α se pueden determinar mediante estudios con animales. Cuando se utilizan ensayos con animales, se administra una dosis para proporcionar una concentración de tejido objetivo similar a la que ha mostrado ser eficaz en los ensayos con animales.

25 *iii. Composición Farmacéutica*

Las diferentes proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α descritas en este documento (también denominadas aquí como "compuestos activos") se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración. Tales composiciones comprenden típicamente la proteína de fusión y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en este documento el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares, compatibles con administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas son bien conocidos en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, su uso en las composiciones está contemplado. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), e transmucosal. Además, puede ser deseable administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de

la composición farmacéutica de forma local a un área en necesidad de tratamiento. Esto se puede conseguir mediante, por ejemplo, infusión local o regional o perfusión durante la cirugía, aplicación tópica, por inyección, catéter, supositorio o implante (por ejemplo, los implantes formados a partir de materiales porosos, no porosos, o gelatinosos, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras), y similares. En otra modalidad, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica se administra en una vesícula, tales como liposomas (ver, por ejemplo, Langer, Science 249: 1527-1533, 1990 and Treat et al, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, López Berestein and Fidler (eds.), Liss, N. Y., pp. 353-65, 1989).

En aún otra modalidad, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En un ejemplo, se puede utilizar una bomba (ver, 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, se pueden utilizar materiales poliméricos (ver, 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). Otros sistemas de liberación controlada, tales

como los descritos por Langer (Science 249: 1527-1533, 1990), también se pueden utilizar.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los
5 siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales
10 como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; soluciones amortiguadoras tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases,
15 tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser encapsulada en ampollas, jeringas desechables, o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para uso
20 inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en donde soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores apropiados incluyen solución salina
25 fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELO (BASF;

Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de
5 fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol
10 líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la
15 acción de microorganismos se puede lograr 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
20 manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar

incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las

5 dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos

10 preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Para la administración por inhalación, los compuestos se

15 suministran en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por vía

20 transmucosa o transdérmica. Para administración transmucosa o transdérmica, penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes,

25 sales biliares y derivados de ácido fusídico. La

administración transmucosa puede lograrse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la
5 técnica. Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

10 En una modalidad, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros
15 biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para las personas experimentadas en la técnica. Los materiales
20 también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidas a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se puede utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables.
25 Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por

las personas experimentadas en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente Estadounidense No. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para 5 facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosis unitarias para el sujeto a ser tratado con cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo 10 calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto 15 terapéutico particular a ser logrado, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal compuesto funcional para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones 20 para la administración.

iv. Kits

Como se usa en este documento, un "kit" comprende una proteína de fusión de IL-2/IL-2R α para su uso en la modulación de la respuesta inmune, como se describe en 25 este documento. Los términos "kit" y "sistema", como se

usan en el presente documento están previstos para referirse a por lo menos una o más proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α que, en modalidades específicas, están en combinación con uno o más de otros tipos de elementos o
5 componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, recipientes, envases, tales como envases previstos para la venta comercial, instrucciones de uso, y similares).

V. Identidad de Secuencia

10 Como se describió anteriormente, se proporcionan variantes activas y fragmentos de las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α o el polinucleótido que codifica las mismas, incluyendo los diversos componentes de la proteína de fusión de IL-2/ L-2R α . Tales componentes
15 incluyen, IL-2, el dominio extracelular de IL-2R α , las secuencias de enlace o la secuencia Kozak. La actividad retenida por la variante activa o fragmento de la proteína de fusión o un componente dado de la proteína de fusión se discute en más detalle en este documento.

20 Tales variantes pueden tener por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o, o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido o polinucleótido de referencia dado. Un fragmento puede comprender por lo menos 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600,
25 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 nucleótidos contiguos de

una secuencia de nucleótidos de referencia dado o hasta toda la longitud de una secuencia de referencia de nucleótidos dada; o un fragmento puede comprender por lo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 5 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 aminoácidos contiguos o hasta la longitud completa de una secuencia de polipéptidos de referencia dado.

Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias 10 de polinucleótidos o de polipéptidos hace referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada. Cuando se utiliza el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a 15 proteínas se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticas frecuentemente difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras, en donde los residuos de aminoácidos están sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas 20 similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de la identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza 25 conservadora de la sustitución. Las secuencias que

difieren por tales sustituciones conservadoras se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los Medios para hacer este ajuste son bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Típicamente esto
5 implica calificar una sustitución conservadora como una incompatibilidad parcial en lugar de una completa, lo que aumenta el porcentaje de identidad de secuencia. Así, por ejemplo, en donde se da un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y una sustitución no conservadora se le
10 da una puntuación de cero, una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. Se calcula la puntuación de las sustituciones conservadoras, por ejemplo, como es implementado en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

15 Como se usa en este documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de poli nucleótido en la ventana de comparación
20 puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que
25 la base de ácido nucleico idéntica o el residuo de

aminoácido ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando
5 el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencias proporcionados en este documento se refieren al valor obtenido utilizando GAP
10 Versión 10 usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando Peso GAP de 50 y Longitud de Peso de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.CMP; % de identidad y % de similitud para una secuencia de
15 aminoácidos usando peso GAP de 8 y Longitud de Peso de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente del mismo. Por "Programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencia que, para cualquier par de secuencias en cuestión, genera
20 una alineación que tiene de nucleótidos idénticos o coincidencias de residuos de aminoácidos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico en comparación con la alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.

Tal como se usa en el presente documento, los
25 términos singulares "un", "una" y "el" incluyen los

referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" se pretende que incluya "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, debe ser
5 entendido que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

10 La materia objeto de la presente descripción se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EXPERIMENTAL

IL-2 es un producto biológico que se ha utilizado en
15 los intentos de aumentar la respuesta inmune en pacientes con cáncer y VIH/AID. Más recientemente se han utilizado dosis mucho más bajas de IL-2 para aumentar selectivamente la tolerancia para suprimir las respuestas inmunes no deseadas asociadas con el ataque autoinmune de
20 los propios tejidos. Es importante destacar que estas dosis bajas de IL-2 no han mostrado signos de mejora o re-activación de las células T autorreactivas. Sin embargo, IL-2 tiene inconvenientes importantes como un agente terapéutico, incluyendo una semivida *in vivo* muy
25 corta, lo que limita su eficacia y toxicidad a dosis

altas. Por estas razones, ha sido elaborada una nueva IL-2 biológica con el objetivo de mejorar su farmacocinética y la durabilidad de las respuestas de uso 1) en la terapia a base de IL-2 a dosis bajas para aumentar las células T reguladoras (Tregs) y la tolerancia inmune y 2) en la terapia adyuvante con dosis más altas para aumentar la respuesta inmune y la memoria. Para alcanzar estos objetivos, se han desarrollado las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α , en donde estas fusiones se han diseñado para aumentar la disponibilidad de IL-2 mediante el aumento persistente de la estimulación de IL-2 de los linfocitos que portan IL-2R *in vivo*. Estas fusiones consisten en proteínas modificadas genéticamente de la siguiente manera (Fig. 1): 1) una secuencia líder de IL-2 que contiene una secuencia de Kozak optimizada para la traducción eficaz; 2) la secuencia de longitud completa de IL-2; 3) una secuencia de enlazador de glicina o glicina/serina de longitud variable; 4) la secuencia de codificación del dominio extracelular expresado de IL-2R α ; 5) un separador de glicina de 2 aminoácidos; 6) una región de poli-histidina de seis aminoácidos para la purificación; y 7) dos codones de terminación. Las secuencias de proteínas predichas a partir de estos ADNc de ratones y humanos se muestran para las proteínas de fusión de IL-2/(GlySer)/IL-2R α en las Figuras 2A y 2B,

respectivamente. Estos ADNc fueron clonados en el vector de expresión pCIneo y se utilizan para la expresión de estas proteínas de fusión en las células COS7. El análisis de los sobrenadantes de cultivo indicó que cada

5 proteína de fusión de ratón exhibió bioactividad de IL-2 *in vitro*, con una actividad óptima asociada a la proteína de fusión de IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α (Fig. 3A). Por consiguiente, la inclusión de anti-IL-2 en este bioensayo inhibió completamente la proliferación (Fig. 3B). Grandes

10 cantidades de IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α e IL-2/(Gly₄Ser)₄/IL-2R α se prepararon después de la expresión en células CHO y se purificaron por cromatografía de afinidad a través de la unión de la etiqueta 6x His de la proteína de fusión al níquel inmovilizado. La proteína de fusión de

15 IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α de ratón mostró mayor bioactividad de IL-2 que IL-2/(Gly₄Ser)₄/IL-2R α (Fig. 4A) a pesar de que ambas proteínas de fusión de manera similar inhibieron la unión de dos anticuerpos anti-IL2R α (PC 61 y 7D4) (Fig. 4B) a células que expresan IL-2R α , lo que

20 confirma una mayor actividad de la IL-2 se asocia con la primera proteína de fusión. La inhibición de la unión de PC61 y 7D4 también indica que la porción de IL-2R α de la proteína de fusión conserva suficiente estructura terciaria para unir estos anticuerpos. Sin embargo, estas

25 proteínas de fusión no inhiben la unión de un anticuerpo

monoclonal (3C7) dirigido al sitio de unión de IL-2 de IL-2R α , a células que expresan IL-2R α . Este resultado implica que la IL-2 dentro de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α está espacialmente cerca del sitio de unión

5 de IL-2R α (Fig. 5). El análisis de Western blot de estas proteínas de fusión mostró que la IL-2/IL-2R α era 55-65 kDa, con movilidad algo más rápida bajo condiciones no reductoras, y que fue aproximadamente 15 kDa mayor que la observada para IL-2R α soluble (Figura 6A). En

10 consecuencia, el análisis directo de IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α de ratón purificada por SDS-PAGE era consistente con una proteína de monómero de 55-65 kDa heterogénea (Fig. 6B), que es el tamaño esperado para una molécula de fusión de IL-2 (15 kDa) y IL-2R α (40-50kDa) (Figs. 6A y

15 6B), en donde IL-2R α muestra heterogeneidad de tamaño debido a la amplia glicosilación variable (Malek and Korty, J. Immunol 136: 4092-4098, 1986). Una consecuencia inmediata de la transducción de señal dependiente de IL-2 es la fosforilación de tirosina de STAT5 (pSTAT5). El

20 tratamiento de ratones con IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α de ratón resultó en la activación extensa y selectiva de pSTAT5 en Tregs 30 min después del tratamiento (Fig. 7). Los estudios de dosis-respuesta mostraron que IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α de ratón afectó a una serie de

25 actividades clave de Tregs *in vivo* (Figs. 8A -8D). Estos

efectos sobre Tregs incluyen: representación incrementada (Fig. 8A) y el número (no mostrado) de Tregs en el compartimento de células T CD4⁺; la sobrerregulación de CD25 dependiente de IL-2 (Figura 8B); proliferación incrementada mientras se evalúa por la expresión del marcador de proliferación Ki67 (Fig. 8C); y fracción incrementada del subconjunto Treg Klrp1⁺ diferenciado terminalmente dependiente de IL-2 (Fig. 8D). Estos efectos fueron más sorprendentes para Tregs en el bazo y el páncreas inflamado de los ratones diabéticos no obesos (NOD). 1000 unidades de actividad de IL-2, tal como se mide en el bioensayo CTLL IL-2 estándar, asociadas con IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α mostraron menores, pero efectos fácilmente medibles en Tregs (Figs. 8A - 8D). Ratones C57/BL6 tratados con IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α (2000 unidades de actividad de IL-2) se compararon con los ratones que recibieron IL-2 recombinante (25,000 unidades) o complejos de agonistas de IL-2/anti-IL-2 (IL2/IC) (10,000 unidades de actividad de IL-2) (Fig. 9). IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α era mucho más eficaz que la IL-2 recombinante y ligeramente más eficaz que IL2/IC en la inducción de aumento persistente de Tregs y las propiedades relacionadas (Fig. 9). Estos aumentos en Tregs tolerogénicas ocurrieron en niveles menores de 5 y 12.5 veces de actividad de IL-2 en comparación con IL2/IC

e IL-2 recombinante, respectivamente. Cuando se considera la activación de pSTAT5 dependiente de IL-2 en Tregs directamente ex vivo (Fig. 9), estos datos sugieren una semivida biológica de aproximadamente 72 horas para IL-2/IL-2R α . Los ratones NOD prediabéticos se sometieron a un tratamiento corto con bajas cantidades de IL-2/IL-2R α (Fig. 10). Se observó un retraso en el inicio de la diabetes en los ratones que fueron tratados con 800 U de actividad de IL-2 asociada con IL-2/IL-2R α . Con respecto a la inmunidad, la aplicación de una única dosis alta de IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α (12,000 U de la actividad de IL-2) también aumentó sustancialmente las respuestas de las células T CD8⁺, especialmente las células de memoria tuvieron larga vida (Fig. 11). Poco después de la inmunización (día 28), células efectoras de memoria (EM) CD44^{hi} CD62L^{lo} CD127^{hi} dominaron el banco de memoria; Sin embargo, al aumentar el tiempo las células memoria central (CM) CD44^{hi} CD62L^{hi} CD127^{hi} aumentaron, y las células CM dominaron el grupo de memoria 202 días después de la inmunización (Figs. 12A - 12B). Por lo tanto, IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α funciona de una manera análoga a la IL-2 recombinante para aumentar las Tregs tolerogénicas y supresoras inmunes y la inmunidad mediante el aumento de las respuestas efectoras T/de memoria, pero exhibe farmacocinética mejorada mediante la liberación de tales

respuestas : 1) en niveles inferiores eficaces de la actividad de IL-2; 2) con respuestas biológicas más persistentes; y 3) la conservación de la jerarquía con Tregs sensibles a dosis más bajas que las células efectoras T/de memoria. Estos hallazgos apoyan la noción de que proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α representan una clase mejorada y nueva de fármacos para liberar la actividad de IL-2 para aumentar selectivamente la tolerancia inmune o memoria inmune cuando se administra a la dosis y el régimen apropiados.

Las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α también fueron producidas que comprenden IL-2 humana y IL-2R α humana (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 en base a la etiqueta 6x-His. Las proteínas de fusión variaron en la longitud de los enlaces de glicina/serina de una manera análoga a los utilizados para la IL-2/IL-2R α de ratón. Todas las 4 de las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α humanas resultantes exhibieron bioactividad de IL-2 utilizando el ensayo de CTLL de ratón (Fig. 13A). El análisis de Western blot confirmó que la IL-2/IL-2R α humana también mostró una banda heterogénea entre 55-60 kDa (Fig. 13B), consistente con moléculas altamente glicosiladas esperadas para la IL-2 relacionada con IL-2R α . Las proteínas de fusión de IL-

2/IL-2R α con los enlazadores (G₃S)₃ y especialmente (G₄S)₄ pueden tener una mayor actividad ya que se ve menos proteína de fusión a pesar de que una cantidad equivalente de actividad de IL-2 se cargó en cada carril (Fig. 13B).

5 La capacidad de la proteína de fusión para inhibir la unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-2R α , M-A257 y BC96, a las células que portan el IL-2R α humano indica que IL-2R α de la proteína de fusión conserva suficiente estructura terciaria para unir estos anticuerpos (Fig.

10 14). Sin embargo, estas proteínas de fusión inhibieron sólo parcialmente la unión de un anticuerpo monoclonal (BC96) dirigido al sitio de unión de IL-2 de IL-2R α , dando a entender que la IL-2 dentro de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α es espacialmente cerca del sitio de unión de

15 IL-2R α . Por otra parte, se estimó la actividad específica de las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α de humano y de ratón y que contienen el enlazador (G₃S)₃ es 80 y 2000 pM, respectivamente, por 1 unidad/ ml de actividad de la bioactividad de IL-2. Estos valores son mucho mayores que

20 la actividad de IL-2 recombinante, que es 10 pM en 1 unidad/ml. Las actividades distintas entre IL-2/IL-2R α de humano y de ratón se representaron por lo menos parcialmente por una ineficacia relativa de la proteína de fusión humana para apoyar la proliferación de células CTLL

25 de ratón en el bioensayo en comparación con las proteínas

de fusión de ratón o IL-2 recombinante de ratón y de humano (no se muestra). Estas actividades específicas relativamente bajas y los resultados de bloqueo del anticuerpo (Figs. 5 y 12A-12B) plantearon la posibilidad
5 de que existe una interacción intramolecular específica entre IL-2 y IL-2R α 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 la IL-2R. Para probar directamente esta noción, dos residuos de
10 arginina en el sitio de unión de IL-2 del IL-2R α de humano (ver Robb et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 5654-5658, 1988) fueron mutados a treonina y serina. Se detectó mucho mayor bioactividad asociada con estas proteínas de fusión de IL-2R mutantes (Fig. 15); la actividad
15 específica de las proteínas de fusión de IL-2/IL-2R α mutadas se estimó en aproximadamente 5 pM de 1 unidad/ml de la actividad de IL-2, un valor muy similar al IL-2 recombinante. Por lo tanto, estos datos indican que IL-2/IL-2R α de humano es biológicamente activo y un mecanismo
20 de acción específico que da cuenta de la actividad de IL-2 prolongada en estas proteínas de fusión es a través de una interacción competitiva entre el resto de IL-2 con la región de unión de IL-2 de IL-2R α de la proteína de fusión y con células que expresan el IL-2R.

Tabla 1. Resumen de Secuencias

SEC ID NO	AA/NT	Fuente	Descripción	
5	1	AA	Humana	IL-sin procesar
				No. de Acc. De GenBank IL-2 myrmqllsci alsalavtns aptssstkkt qlqlehilid Iqmilnginn yknpkltmrmltfkfympkka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgsettfmceyade tativeflnr witfcqsiis tit
10	2	AA	Humana	IL-2-forma madura
				AAB46883 de GenBank con los primeros 20 aa eliminados aptssstkkt qlqlehilid Iqmilnginn yknpkltmrmltfkfympkka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tit
15	3	AA	Ratón	IL-2 sin procesar
				No.de Acc. P04351 MYSMQLASCV TLTLVLLVNS APTSSSTSSS TAEAQQQQQQ QQQQQQHLEQ LLMDLQELLS RMENYRNLKL PRMLTFKFYL PKQATELKDL QCLEDELGPL RHVLDL TQSK SFQLEDAENF ISNIRVTVVK LKGSNDTFEC QFDDESATVV DFLRRWIAFC QSIISTSPQ
	4	AA	Ratón	IL-2 forma madura
				Forma Madura del Acc. No. P04351 APTSSSTSSS TAEAQQQQQQ QQQQQQHLEQ LLMDLQELLS RMENYRNLKL PRMLTFKFYL PKQATELKDL QCLEDELGPL RHVLDL TQSK SFQLEDAENF ISNIRVTVVK LKGSNDTFEC QFDDESATVV DFLRRWIAFC QSIISTSPQ
20	5	AA	Humana	IL-2R α forma sin procesar
				No. de acc. de Genebank NP_000408.1 Mdsyllmwgl ltfimvpgcq aelcdddppe iphatfkama ykegtmlnce ckrgfrriksgslymlctgn sshsswdnqc qctssatrnt tkqvtpqpee qkerkttemq spmqpvdqaslpghcreppp weneateriy hfvvgqmvyq qcvqgyralh rgpaesvckm thgktrwtqpqltgemet sqfpgeekpq aspegrpese tsclvttttdf qiqtemaatm etsiftteyqvavagcvfll isvlllsgit wqrrqrksrr ti

5	6	AA	Humana	IL-2R α forma madura	Primeros 1-21 AA eliminados de NP 000408.1 elcdddppe iphatfkama ykegtmlnce ckrgfrriksqsllymlctgn sshsswdnqc qctssatrnt tkqvtpppee qkerkttemq spmqpvdqas lpghcreppp weneateriy hfvvgqmvyy qcvqgyralh rgpaesvckm thgktrwtqpqlictgemet sqfpgeekpq aspegrpese tsclvtttdf qiqtemaatm etsiftteyqvavagcvfll isvlllsgit wqrrqrksrr ti
	7	AA	Humana	Forma madura de IL-2R α dominio extracelular	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK SGSL YMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTIKQVTPQPEEQ KERKTT EMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFWVG QMVYYQ CVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEME TSQFPG EEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETS IFTTE YQ
	8	AA	Ratón	IL-2R α Forma sin procesar	No. de Acc. NP 032393.3 meprllmlgf IslIivpscr aelclydppe vpnatfkals ykngtilnce ckrgfrrlkelvymrclgns wssncqctsn shdksrkqvt aqlehqkeqq tttmqkptq smhqenltghcrepppwkhe dskriyhve gqsvhyecip gyka Iq rgpa isickm kcgk tgwtq pqltcvdereh h rfl aseesqgsrn sspesetscp itttdfpqpt ettamtetfv Itmeykvavasclfilisil llsgltwqhr wrksrtri
10	9	AA	Ratón	IL-2R α forma madura	1-21 aa eliminados de Acc. No. NP 032393.3 elclydppe vpmatfkals ykngtilnce ckrgfrrlke Ivymrclgns wssncqctsn shdksrkqvt aqlehqkeqq tttmqkptq smhqenltgh crepppwkhe dskriyhve gqsvhyecip gykalrgpa isickmkcgk tgwtqpqltc vderehhrfl aseesqgsrn sspesetscp itttdfpqpt ettamtetfv Itmeykvava sclfilisilllsgltwqhr wrksrtri
	10	AA	Ratón	Forma madura de IL-2R α dominio extracelular	elclydppe vpmatfkals ykngtilnce ckrgfrrlke Ivymrclgns wssncqctsn shdksrkqvt aqlehqkeqq tttmqkptq smhqenltgh crepppwkhe dskriyhve gqsvhyecip gykalrgpa isickmkcgk tgwtqpqltc vderehhrfl aseesqgsrn sspesetscp itttdfpqpt ettamtetfv Itmeyk
15	11	AA		Enlazador (Gly3Ser) 4	GGSGGGSGGGSGGGS
20					
25					

5

10

15

20

12	AA		Enlazador (Gly3Ser)2	GGGSGGGS
13	AA		Enlazador (Gly3Ser)3	GGGSGGGS
14	AA		(Gly3Ser)5	GGGSGGGS
15	AA		Enlazador Gly3	ggg
16	AA	Ratón	Forma madura del IL-2 (Gly4Ser)4-dominio extracelular del IL2R α	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELL SRMENYRNLKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRH VLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTWVKLGSDNTFECQFDDDES ATWDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG ELCLYDPPEVPNATFKALSYPKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMR CLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTIDMQKPT QSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYK ALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHRFLASEESQG SRNSSPESETSCPTTIDFPQPTETIAMTETFLTMEYK
17	AA	Ratón	Forma Sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)4-dominio extracelular del IL2R α	MDSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQ Q QHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLMTFKFYLPKQATELK DLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTWVKLG GSDNTFECQFDDDESATWDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGG GGSGGGSGGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYPKNGTILNCECK RGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQ KEQQTTIDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVE GQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDE REHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPTTIDFPQPTETTAMT ETFLTMEYK
18	AA	Ratón	Forma madura del IL-2 (Gly4Ser)5-dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRME NYRNLKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDL TQSKSFQLEDAENFISNIRVTWVKLGSDNTFECQFDDDESATV VDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSELCLYDPPEVPNATFKALSYPKNGTILNCECKRGFRRLKEL VYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTID MQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHF VEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQL TCVDEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPTTIDFPQPTETI AMTETFLTMEYK

25

5

10

15

20

19	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)5- dominio extracelular del IL-2R α	MDSMQLASCVTLLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQ QQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRL TFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSF QLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDDDESATVV DFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKR GFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTA QLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPWKH EDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMK CGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPES ETSCPITITDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK
20	AA	Ratón	Forma madura del IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRM ENYRNLKLPRLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHML DLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDD ESATVWDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGGSE LCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYM RCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQK PTQSMHQENLTGHCREPPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECI PGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLA SEESQGSRNSSPESETSCPITITDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK
21	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	MDSMQLASCVTLLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQ QQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKFYLPKQATEL KDLQCLEDELGPLRHMLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVK LKGSNTFECQFDDDESATVWDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGS GGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECK RGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEH QKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPWKHEDSKRIYHF VEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCV DEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITITDFPQPTETIA MTETFVLTMEYK
22	AA	Humana	Forma madura de IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVMLELKGSETIFMCEYADETATMEFLNRWITFCQSII STLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSELDDDPPEIPHATFKAMA YKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCT SSATRNTIKQVTPQPEEQKERKTIEMQSPMQPVDQASLPGHCR EPPPWENEATERIYHFVWGQMYQCVQGYRALHRGPAESVCK MTHGKTRWTPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESET SCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ

25

5

23	AA	Humana	Forma sin procesar IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISINVMLELKGSETIFMCEYADETATMEF LNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD NQCQCTSSATRNTIKQVTPQPEEQKERKTIEMQSPMQPVDQASLPG HCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCK MTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLV TTIDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
24	AA	Humana	Forma madura IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVMLELKGSETIFMCEYADETATMEFLNRWITFCQSIIST LTGGGSGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTI KQVTPQPEEQKERKTIEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENE ATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWT QPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTIDFQI QTEMAATMETSIFTTEYQ
25	AA	Humana	Forma sin procesar IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNL LAQSKNFHLRPRDLISININVLELK GSETIFMCEYADETATMEFLNRWITFCQSIISTLTGGG SGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSA TRNTIKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHC REPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPA ESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASP EGRPESETSCLVTTIDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
26	AA	Humana	Forma madura IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISIN VMLELKGSETIFMCEYADETATMEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSG GGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTIKQVTPQPEEQ KERKTIEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTIDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ

10

15

20

25

27	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del IL-2R α	MDRMQLLSIALSLALVTNSAPTSSTTKTKQLQLEHLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVMLELKGSETIFMCEYA DETATMEFLNRWMTFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDD PPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGN SSHSSWDNQCCQCTSSATRNTIKQVTPQPEEQKERKTTMQSPM QPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVWGQIMYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQFPGEKPK QASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTIEYQ
28	NT	Humana	Secuencia Kozak optimizada de IL-2 líder	gccaccATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATGCACTAA GTCTTGCACTIGTCACAAACAGT
29	NT	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTACATIGACACTTGTGCTC CTTGTCACACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAGCTCTACAGCG GAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACTGG AGCAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAGCAGGATGGAGAA TIACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCAOCTICAAATTTTACTI GCCCCAAGCAGGCCACAGAATIGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATG AACTTGGACCTCTGCGGCATGTCTGGATTGACTCAAAGCAAAAGC TTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTCATCAGCAATATCAGAGTAACT GTTGTAAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGCCAATTGGA TGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCT TCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAggtggaggtgat Ctggtggaggtgatcaggtggaggtggatccggtggaggtgg atcGAACTGTGTCTGTATGACCCACCCGAGGTCCCCAATGCCACA TTCAAAGCCCTCTCTACAAGAACGGCACCATCTAACTGTGAATGC AAGAGAGGTTTCCGAAGACTAAAGGAATTGGTCTATATGCGTTGCTTA GGAACTCCTGGAGCAGCAACTGOCAGTGCAACAGCAACTCCCATGAC AAATCGAGAAAGCAAGTTACAGCTCAACTTGAACACCAGAAAGAGCAA CAAACCACAACAGACATGCAGAAGCCAACACAGTCTATGCACCAAGA GAACCTTACAGGTCACTGCAGGGAGCCACCTCCTTGAAACATGAAGA TTCCAAGAGAATCTATCATTTCTGTTGAAGGACAGAGTGTTCCTACTAG AGTGTATTCGGGGATACAAGGCTCTACAGAGAGGTCTGCTATTAGC ATCTGCAAGATGAAGTGTGGGAAAACGGGGTGGACTCAGCCCCAGCT CACATGTGTAGATGAAAGAGAACACACCGATTTCTGGCTAGTGAGGA ATCTCAAGGAAGCAGAAATCTTCTCCCGAGAGTGAGACTTCTGCCC CATAACCACCACAGACTTCCACAAACCACAGAAACAACCTGCAATGAC GGAGACATTTGTGCTCACAATGGAGTATAAGGGTGGACATCACCATCA CCATCACTAATAA

5

10

15

20

30	NT	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser) ⁴ -dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTACATTGACACTTG TGCTCCTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAG CTCTACAGCGGAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA G CAGCAGCACCTGGAGCAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTC CTGAGCAGGATGGAGAATTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGG ATGCTCACCTTCAAATTTTACTTGCCCAAGCAGGCCACAGAA TTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATGAACTTGACCTCTG CGGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAAGCTTCAATTG GAAGATGCTGAGAATTTATCAGCAATATCAGAGTAACTGTT GTAAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGCCAATTC GATGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGG ATAGCCTTCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAggt Ggaggttctggtggaggttcaggtggaggttcgggtggaggt tctGAACTGTGTCTGTATGACCCACCCGAGGTCCCCAATGCC ACATTCAAAGCCCTCTCCTACAAGAACGGCACCATCCTAAAC TGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTAAAGGAATTGGTC TATATGCGTTGCTTAGGAACTCCTGGAGCAGCAACTGCCAG TGCACCAGCAACTCCCATGACAAATCGAGAAAGCAAGTTACA GCTCAACTTGAACACCAGAAAGAGCAACAAACCACAACA GACATGCAGAAGCCAACACAGTCTATGCACCAAGAGAA CCTTACAGGTCACTGCAGGGAGCCACCTCCTTGGAAC ATGAAGATTCCAAGAGAATCTATCATTTCTGGAAGGA CAGAGTGTTCACTACGAGTGTATTCCGGGATACAAGGC TCTACAGAGAGGTCCTGCTATTAGCATCTGCAAGATGA AGTGTGGGAAAACGGGGTGGACTCAGCCCCAGCTCACA TGTGTAGATGAAAGAGAACACCACCGATTTCTGGCTAG TGAGGAATCTCAAGGAAGCAGAAATTCTTCTCCCGAGA GTGAGACTTCCTGCCCCATAACCACCACAGACTTCCA CAACCCACAGAAACAAGTCAATGACGGAGACATTTGT GCTCACAATGGAGTATAAGGGTGGACATCACCATCACC ATCACTAATAA
----	----	-------	---	--

25

5

10

15

20

31	NT	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)5- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTACATTGACACT TGTGCTCCTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTT CAAGCTCTACAGCGGAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCACCTGGAGCAGCTGTTGATGGACCTACAG GAGCTCCTGAGCAGGATGGAGAATTACAGGAACCTGAAACTC CCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTTGCCCAAGCAGGCCA CAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATGAACTTGGACC TCTGCGGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAAGCTTTCAA TTGGAAGATGCTGAGAATTCATCAGCAATATCAGAGTAACT GTTGTAAAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGCCAATT CGATGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGGA TAGCCTTCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAggggag gtggatcaggtagAggtggatctggtagggtggatcaggtag ggtagatcggtagggtggatctGAAGTGTGTCTGTATGACCC ACCCGAGGTCCCCAATGCCACATTCAAAGCCCTCTCCTACAAGA ACGGCACCATCCTAAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGA CTAAAGGAATTGGTCTATATGCGTTGCTTAGGAACTCCTGGAG CAGCAACTGCCAGTGCACCAGCAACTCCCATGACAAATCGAGAA AGCAAGTTACAGCTCAACTTGAACACCAGAAAGAGCAACAAACC ACAACAGACATGCAGAAGCCAAACACAGTCTATGCACCAAGAGAA CCTTACAGGTCACTGCAGGGAGCCACCTCCTTGGAAACATGAAG ATTCCAAGAGAATCTATCATTTCTGTTGAAGGACAGAGTGTTTAC TACGAGTGTATTCCGGGATACAAGGCTCTACAGAGAGGTCTGCTG TATTAGCATCTGCAAGATGAAGTGTGGGAAAACGGGGTGGACTC AGCCCCAGCTCACATGTGTAGATGAAAGAGAACACCAACCGATTT CTGGCTAGTGAGGAATCTCAAGGAAGCAGAAATTCTTCTCCCGA GAGTGAGACTTCTGCCCCATAACCACACAGACTTCCACAAC CCACAGAAACAACTGCAATGACGGAGACATTTGTGCTCACAATG GAGTATAAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA
32	NT	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAGAAAACACAGCT ACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAATCCCAAACTCAACAGGATGCTCACATTTAAGTT TTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTGAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTgtggaggtggatcgg tggaagtgatcaggtagggtggatcggtagggtggatc GAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCCACACGCCACAT TCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGA ATGCAAGAGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACT

25

5

10

15

20

				CTATATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTOCTGCTG GGACAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAA CACAACGAAACAAGTGACACCTCAAOCCTGAAGAACAGAA AGAAAGGAAAAACCACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGC CAGTGGACCAAGOGAGOCCTCCAGGTCACTGCAGGGAAC TCCACCATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCA TTTCTGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCCTCCA GGGATACAGGGCTCTACACAGAGGTCTGCTGAGAGCGT CTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCC CCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAAGTCAGTT TCCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCG TCTGAGAGTGAGACTTCTGCTGCTGCTCACAACAACAGA TTTTCAAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGAC GTCCATATTTACAACAGAGTACCAGGGTGACATCACCA TCACCATCACTAATAA
33	NT	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTOCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTC TTGCACTTGTACAAACAGTGCACTACTTCAAGTTCTAC AAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTACTGCTGGAT TTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATC CCAAACCTACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTACATGCC CAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAA GAAGAAGCTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTC AAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAG CAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACCTAAAGGGATCTGAA ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCA TTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAG CATCATCTCAACACTGACTggtgaggttctggtgaggt ttaggtgaggttctggtgaggttctGAGCTCTGTGAAG ATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATTCAAGCCAT GGCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAG AGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGC TCTGTACAGGAACTCTAGCCACTOCTGCTGCGGACAACCA ATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAA CAAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAA CCACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGC GAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAA AATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTCGTGGTGGGGC AGATGGTTTATTATCAGTGCCTCCAGGGATACAGGGCTCT ACACAGAGGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCAC GGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCCAGCTCATATGCACAG GTGAAATGGAGAACAGTCAGTTTCCAGGTGAAGAGAAGCC TCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGCTCTGAGAGTGAGACTTCC TGCTCGTCAACAACAAGATTTTCAAATACAGACAGAAA TGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGAGTA CCAGGGTGACATCACCATCACCATCACTAATAA

25

5

10

15

20

34	NT	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3-dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTGCACTAAGTCT TGCACCTGTGCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAA AGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTTA CAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAA ACTCAACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTACATGCCAAGA AGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAA CTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAAAGTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATAT CAACGTAATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAAACAACAT TCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAA TTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTC AACACTGACTggtggaggttctgggaggttcagggtgag gttggGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACAC GCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGT TGAAGTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGC GGGTCACTCTATATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTC GTCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACT CGGAACACAAGGAAACAAGTGACAACCTCAACCTGAAGAAC AGAAAGAAAGGAAAACACAGAAATGCAAAGTCCAAATGCA GCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAA CCTCCACCATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAAATTTATCA TTCTGTGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCCTCAG GGATACAGGGCTCTACACAGAGGTCTGCTGAGAGCGTC TGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCC AGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAGTCAGTTTCC AGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGTCT GAGAGTGAGACTTCTGCTGCTCACAACAACAGATTTTC AAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGAAGTCCAT ATTTACAACAGAGTACCAGGGTGGACATCACCATCAACAT CACTAATAA
35	NT		Consenso Kozak	(gcc)gccRccAUGG
36	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3-dominio extracelular del IL-2R α	MYSQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTA EAAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNL KLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRH VLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTWKLKGSNDNF ECQFDDDESATWDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSG GSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNC ECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDK SRKQVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTG HCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKA LQRGPAISIC27KMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHH RFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMEYK

25

5

37	AA	Ratón	Forma madura del IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del IL-2R α	MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTAFAQQQQQQ QQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNILKLPRLTFKYL PKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFI SNIRVTWKLKGSNTFECQFDDDESATWDFLRRLWAFQCSII STSPQGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGT ILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSR KQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPW KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKC GKTGWTQPQLTCVDEREHIRFLASEESQGSRNSSPESETSC PITTTDFPQPTETTAMTETFLTMEYK
38	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)5- dominio extracelular del IL-2R α	MDRMQLLSIALSLALVTNSAPTSSSTKTKQLQLEHLL LDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKATELKHL QCLEEELKPLEEVNLAAQSKNFHLRPRDLISNINVM ELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDPPEIPHAT FKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSH SWDNQCCQCTSSATRNNTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPM QPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFWGQMYYQCV QGYRALHARGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQ FPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATME TSIFTEYQ
39	AA	Humana	Forma madura del IL-2 humano (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTKTKQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLT RMLTFKFMPPKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAAQ SKNFHLRPRDLISNINVMELKGSETTFMCEYADET ATVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGSELCDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNCCQCTSS ATRNNTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFWGQMYYQCVQGYRALH RGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQFPGEE KPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSI FTTEYQ
40	AA		Secuencia de enlazador (Gly4Ser)4	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
41	NT		Secuencia de enlazador (Gly4Ser)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

10

15

20

25

5

10

15

20

42	NT	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTACATTGACACT TGTGCTCCTTGTCAACAGCGCAGCCCACTTCAAGCTCTACTT CAAGCTCTACAGCGGAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCACCTGGAGCAGCTGTTGATGGACCTACA GGAGCTCCTGAGCAGGATGGAGAATTACAGGAACCTGAAAC TCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTTGCCCAAGCAG GCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATGAACT TGGACCTCTGCGGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAA GCTTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTTCATCAGCAATATC AGAGTAACTGTTGTAAACTAAAGGGCTCTGACAACACATT TGAGTGCCAATTCGATGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACT TTCTGAGGAGATGGATAGCCTTCTGTCAAAGCATCATCTCA ACAAGCCCTCAAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTTCAAGGTGG AGGTTCCGAACTGTGTCTGTATGACCCACCCGAGGTCCCCA ATGCCACATTCAAAGCCCTCTCCTACAAGAACGGCACCATC CTAAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTAAAGGA ATTGGTCTATATGCGTTGCTTAGGAACTCCTGGAGCAGCA ACTGCCAGTGCACCAGCAACTCCCATGACAAATCGAGAAAG CAAGTTACAGCTCAACTTGAACACCAGAAAGAGCAACAAAC CACAACAGACATGCAGAAGCCAACACAGTCTATGCACCAAG AGAACCTTACAGGTCAGTGCAGGGAGCCACCTCCTTGAAA CATGAAGATTCCAAGAGAATCTATCATTTTCGTGGAAGGACA GAGTGTTCACTACGAGTGTATTCCGGGATACAAGGCTCTAC AGAGAGGTCTGCTATTAGCATCTGCAAGATGAAGTGTGGG AAAACGGGGTGGACTCAGCCCCAGCTCACATGTGTAGATGA AAGAGAACACCACCGATTTCTGGCTAGTGAGGAATCTCAAG GAAGCAGAAATTCTTCTCCCGAGAGTGAGACTTCCTGCCCC ATAACCACCACAGACTTCCACAACCCACAGAAACAACCTGC AATGACGGAGACATTTGTGCTCACAATGGAGTATAAGGGT GGACATCACCATCACCATCACTAATAA
43	AA	Humana	Forma madura IL-2 (Gly3Ser)2- dominio extracelular del IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRP RDLISNINVMLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWIT FCQSIISTLTGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQCTSS ATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCR EPPWENEATERIYHFVWQMVYYQCVQGYRALHRGPAESV CKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKQASPEGRPE SETSCLVTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ

25

5

10

15

20

44	AA	Humana	Forma sin procesar IL-2 (Gly3Ser)2- dominio extracelular del IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLD LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCQCLE EELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISINVMLELKGSE TTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGG SELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH FVVGQIMYYQCVCQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQ LICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQ IQTEMAATMETSIFTTEYQ
45	AA	Humana	Forma madura del IL- 2 (Gly3)- dominio extracelular del IL- 2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLCQCLEEELKPLEEVNLNAQSKNFHL RPRDLISINVMLELKGSETTTFMCEYADETATVEFLNR WITFCQSIISTLTGGGELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGT MLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSS ATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGH REPPPWENEATERIYHFVVGQIMYYQCVCQGYRALHRGPAE SVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEG RPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
46	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3)- dominio extracelular del IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLD LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCQCLE EELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISINVMLELKGSE TTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGELCD DDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYM LCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERK TTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG QIMYYQCVCQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTE MAATMETSIFTTEYQ
47	NT	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)2- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTIGCATIGCACTAAGTC TTGCACTTGTCACAAACAGTGCACTACTTCAAGTTCTAC AAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTIACCTGCTGGAT ITACAGATGATTIGAATGGAATTAATAATACAGAATC CCAACTCAACCAGGATGCTCACATTIAAGTTTIACATGCC CAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAA GAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTAGCTC AAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTIATCAG CAATATCAACGTAATAGTCTGGAACCTAAAGGATCTGAA ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCA TGTAGAATTICTGAACAGATGGATACCTTTTIGTCAAAG CATCATCTCAACACTGACTggtggaggttctggtggaggt tcaGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACG CCACATCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTT GAACGTGTAATGCA

25

5

10

15

20

				AGAGAGGTTICCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATA TGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACA ACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAA CGAAACAAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAA GGAAAACACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGG ACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCAC CATGGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTICG TGGTGGGGCAGATGGTTIATTATCAGTGCGTCCAGGGAT ACAGGGCTCTACACAGAGGTCTGCTGAGAGCGTCTGCA AAATGACCCACGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCCAGC TCATATGCACAGGTGAAATGGAGACCAGTCAGTTICAG GTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGTCTG AGAGTGAGACTTCTGCTCGTCACAACAACAGATTTC AAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCA TATTIACAACAGAGTACCAGGGTGGACATCACCATCAACC ATCACTAATAA
48	NT	Humana	Forma sin procesar IL-2 (Gly3)- dominio extracelular del IL- 2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTIGCATIGCACTAAGTC TTGCACTTGTCAAAACAGTGCACTACTTCAAGTTCTAC AAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTIACGTCTGGAT ITACAGATGATTTGAATGGAATTAATAATIAACAAGAATC CCAAACTCAACAGGATGCTCACATTIAGTTIACATGCC CAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAA GAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTC AAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTIATCAG CAATATCAACGTAATAGTICTGGAACATAAGGGATCTGAA ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCA TGTAGAATTICTGAACAGATGGATACCTTTTGTCAAAG CATCATCTCAACACTGACTggtaggtGAGCTCTGTGAC GATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATCAAAAGCCAT GGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCAAG AGAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGCGGGTCACTCTATATGC TCTGTACAGGAACTCTAGCCACTCGTCTGGGACAACCA ATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAA CAAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAA CCACAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGC GAGCCTIACAGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAA AATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTICGTGGTGGGGC AGATGGTTTATATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTCT ACACAGAGGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCAC GGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCCAGCTCATATGCACAG GTGAAATGGAGACCAGTCAGTTICAGGTGAAGAGAAGCC TCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGTCTGAGAGTGAGACTTCC TGCTCGTCACAACAACAGATTTCAAATACAGACAGAAA TGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTIACAACAGAGTA CCAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA

25

5

10

15

20

49	NT	Humana	Forma sin procesar IL-2 (Gly4Ser)5- dominio extracelular del IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTIGCATIGCACTAAG TCTTGCACTTGTCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTT CTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTIACGT CTGGATTACAGATGATTTGAATGGAATTAATAATIA CAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATTIAAGTT TIACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTTC AGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTG CTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTICACTTAAGACC CAGGGACTIAATCAGCAATATCAACGTAATAGTICTGG AACTAAAGGGATCTGAAACAACATTATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATGTAGAAATTICTGAACA GATGGATACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTG ACTggtggagggtgatcagggtgaGgtggatcgtgg Aggtggatcagggtgagggtggatccggtggagggtgat dGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACAC GCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCAT GTTGAAGTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCAGAATAA AAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGTACAGGAACTCT AGCCACTCGTCTGGGACAACCAATGTCAATGCACAAG CTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTGACACCTC AACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAACACAGAAATG CAAAGTCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCC AGGTCACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAAAATGAAG CCACAGAGAGAATTTATCATTTCGTGGTGGGGCAGATG GTTTATTATCAGTGCGTCCAGGGATACAGGGCTCTACA CAGAGGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACG GGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCCAGCTCATATGCACA GGTGAAATGGAGACCAGTCAGTTTCCAGGTGAAGAGAA GCCTCAGGCAAGCCCCGAAGGCCGTCTGAGAGTGA GACTTCCTGCCTCGTCACAACAACAGATTTTCAAATA CAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATAT TTACAACAGAGTACCAGGGTGGACATCACCATCACC ATCACTAATAA
50	AA		Enlazador de (Gly4Ser)3	GGGGS GGGGS GGGGS
51	AA		Enlazador de (Gly4Ser)2	GGGGS GGGGS
52	AA		Enlazador de (Gly4Ser)1	GGGGS
53	NT		Secuencia Kozak	gccaccATGG

25

5

54	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQ QQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLIKPRMLT KFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHMLDLTQSKSFQL EDAENFISNIRVTWKLKGSNTFECQFDDSATWDFLR RWMAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEL LYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELV YMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQ TTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHF VEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQP QLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTT DFPQPTETTAMTETFLTMEYKGGHHHHHH
55	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)5- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQ QQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLIKPRML TFKLYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHMLDLTQSKS FQLEDAENFISNIRVTWKLKGSNTFECQFDDSATW DFLRRWMAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCEC KRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQ VTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPP PWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAIS ICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGS RNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFLTMEYK GGHHHHHH
56	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de histidina	MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQ QQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLIKPRML TFKLYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHMLDLTQSKS FQLEDAENFISNIRVTWKLKGSNTFECQFDDSATW DFLRRWMAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGG SELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKE LVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQK EQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKR IYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKT GWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETS CPITTTDFPQPTETTAMTETFLTMEYKGGHHHHHH

10

15

20

25

5

10

15

20

57	AA	Ratón	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDSMQLASCVTLTLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQGGGGG QQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNILKLPRLTFKFYL PKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENF ISNIRVTWKLKGSNDTFECQFDDDESATWDFLRRWIAFCQS IISTSPQGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFKALSYK NGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSH DKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCR EPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAIS ICKMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSS PESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFLVLTMEYKGGHHHH HH
58	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)2- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLD LQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCQL EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVMLELKG SETIFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGS GGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFR RIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNNTKQVT PQPEEQKERKTIEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENE ATERIYHFVWGMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPOASPEGRPESETS CLVTTIDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
59	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVMLE LKGSETIFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTML NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSS ATRNNTKQVTPQPEEQKERKTIEMQSPMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVWGMVYYQCVQGYRALHR GPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP QASPEGRPESETSCLVTTIDFQIQTEMAATMETSIFTI EYQGG HHHHHH

25

5

10

15

20

60	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKKATELKHLL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVM ELKGSETIFMCEYADETATMEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQCT SSATRNTIKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVWGQMVYYQCVQGYRALHR GPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQ ASPEGRPESETSLVTTIDFQIQTEMAATMETSIFTIEY QGGHHHHHH
61	AA	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del IL-2R α + espaciador de glicina y región de polihistidina	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKKATELKHLLQ LEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVMLELK GSETIFMCEYADETATMEFLNRWITFCQSIISTLTGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKE GTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQ TSSATRNTIKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASL PGHCREPPPWENEATERIYHFVWGQMVYYQCVQGYRALH RGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP QASPEGRPESETSLVTTIDFQIQTEMAATMETSIFTTE YQGGHHHHHH
62	AA	Humana	Forma madura IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del mutIL-2 R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFMPPKKATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVMLELKSGSETIFMCEYADETATMEF LNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIP HATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFTSIKSGSLYMLCTGNS SHSSWDNQCCQCTSSATRNTIKQVTPQPEEQKERKTIEVQ SPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVWGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEM ETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSLVTTIDFQIQTEMA ATMETSIFTTEYQ
63	NT	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly3Ser)3- dominio extracelular del mutIL-2 R α Mut	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTIGCATIGCACTAAGTC TTGCACTTGTCACAAACAGTGACCTACTTCAAGTTCTAC AAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTIAGCTGGAT ITACAGATGATTTGAATGGAATTAATAATACAAGAATC CCAACTCACCAGGATGCTCACATTAAAGTTTACATGCC CAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAA GAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTC AAAGCAAACTTICACTTAAGACCCAGGGACTIATCAG CAATATCAACGTAATAGTCTGGAACCTAAAGGGATCTGAA ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCA TGTAGAATTICTGAACAGATGGATIA

25

5

10

15

20

				CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggg gaggttcgggaggttcaggtagggtlogGAGC TCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCCACACGCCA CATICAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGT IGAAGTGTGAATGCAAGAGAGGTTTACCTCAATAA AAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGTACAGGAACT CTAGCCACTCGTCTGGGACAACCAATGTCAATGCA CAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAGTGA CACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAACCA CAGAAATGCAAAGTCCAATGCAGCCAGTGGACCAAG CGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACTCCACCAT GGGAAAATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTG TGGTGGGGCAGATGGTTTATTATCAGTGCGTCCAGG GATACAGGGCTCTACACAGAGGTCTGTGAGAGCT CTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCA GCCCCAGCTCATATGCACAGGTGAAAGGAGACCACT CAGTTTCCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCC GAAGGCCGTCTGAGAGTGAGACTTCTGCCTGCTC ACAACAACAGATTTTCAAATACAGACAGAAATGGCT GCAACCATGGAGACGTCCATTTACAACAGAGTAC CAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA
64	AA	Humana	Forma madura del IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del mutIL-2 R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNL AQSKNFHLRPRDLISINVMLELKGSETTFMCEYAD ETATVEFLNRWTFCCQSIISTLTGGGSGGGSGGG GSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCEC KRGFTSIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCTSSATR NTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHC REPPPWENEATERIYHFVQGMVYQCVQGYRALHRGP AESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPQA SPEGRPESETSLVTITDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
65	NT	Humana	Forma sin procesar del IL-2 (Gly4Ser)4- dominio extracelular del mutIL-2 R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAA GTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGCACTACTTCAAG TTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTTA CTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATA ATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACATT TAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAA CATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGG AGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCA CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACAACATTCA TGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTAGA ATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATC ATCTCAACACTGACTgggaggttcaggtagggtlog

25

5

15

20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión caracterizada porque comprende:

(a) un primer polipéptido que comprende interleucina-2
5 (IL-2) o una variante funcional o fragmento de la misma; y

(b) un segundo polipéptido, fusionado dentro del marco de lectura al primer polipéptido, el segundo polipéptido comprende un dominio extracelular de receptor de interleucina 2 alfa (IL-2R α) o una variante funcional o fragmento del
10 mismo,

en donde la proteína de fusión tiene actividad IL-2.

2. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene una mayor potencia de IL-2 en comparación con IL-2 nativa o
15 recombinante.

3. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque tiene una mayor estimulación de IL-2 persiste incrementada de IL-2R que porta linfocitos *in vivo*, en comparación con IL-2 nativa o
20 recombinante.

4. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque

(a) el primer polipéptido que comprende IL-2 comparte por lo menos 70% de identidad de secuencia con la SEC ID NO:
25 2; y/o,

(b) el segundo polipéptido que comprende el dominio extracelular de IL-2R α comparte por lo menos 70% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 7.

5 5. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque

(a) el primer polipéptido que comprende IL-2 comparte por lo menos 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2; y/o,

10 (b) el segundo polipéptido que comprende el dominio extracelular de IL-2R α comparte por lo menos 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 7.

6. La proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizada porque comprende además una secuencia de unión fusionada dentro del marco de lectura entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

7. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la secuencia de enlazador comprende:

(a) un enlazador de glicina/serina;

20 (b) la secuencia establecida en las SEC ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 40, 41, 50, 51, o 52; o,

(c) una secuencia que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 40, 41, 50, 51, o 52.

25 8. La proteína de fusión de conformidad con la

reivindicación 7, caracterizada porque la proteína de fusión comprende

(a) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOS: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, o 61; o,

(b) una secuencia que tiene por lo menos 80%, 85%, 90%, o 95% a cualquiera de las SEC ID NOS: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, o 61.

9. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque comprende por lo menos una mutación en el dominio extracelular de IL-2R α .

10. La proteína de fusión de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos de conformidad con cualquiera de las SEC ID NOS: 62 o 64; o

(b) una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, o 95% a cualquiera de las SEC ID NOS: 62 o 64.

11. Un polinucleótido caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

12. Una célula hospedera caracterizada porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11.

13. La célula hospedera de conformidad con la

reivindicación 12, caracterizada porque comprende una célula CHO o una célula COS.

14. Un método para fabricar una proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 5 caracterizado porque comprende introducir en una célula hospedera un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y que expresa la proteína de fusión en la célula hospedera.

10 15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el polinucleótido que codifica la proteína de fusión está unido operativamente a un promotor activo en la célula hospedera.

16. Un método para disminuir la respuesta inmune en un 15 sujeto caracterizado porque comprende la administración a un sujeto en necesidad de una disminución en la respuesta inmune de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

20 17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el sujeto tiene una enfermedad autoinmune.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la enfermedad autoinmune comprende 25 diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide,

enfermedad celiaca, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis sistémica, enfermedad de injerto contra hospedero, psoriasis, alopecia areata, o vasculitis inducida por HCV.

5 19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-18, caracterizado porque la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión comprende 10^3 a 10^6 IU de actividad de IL-2 por adulto o $10^4 \pm 100$ veces de la actividad de IL-2 por adulto para disminuir una
10 respuesta inmune.

20. Un método para aumentar la respuesta inmune en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar a un sujeto en necesidad de un aumento en la respuesta inmune de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión
15 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

21. Un método para mejorar la inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto, caracterizado porque comprende:

(a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de conformidad con cualquiera
20 de las reivindicaciones 1-10; y,

(b) administrar al sujeto una vacuna,
en donde la proteína de fusión aumenta la inmunogenicidad de la vacuna.

22. Un método para superar una respuesta inmune
25 suprimida a una vacuna en un sujeto, caracterizado porque

comprende:

(a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y,

5 (b) administrar al sujeto una vacuna,
 en donde la proteína de fusión supera la respuesta inmune suprimida a la vacuna.

23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, caracterizado porque la
10 administración de la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión y la administración de la vacuna es secuencial, en cualquier orden.

24. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, caracterizado porque la
15 administración de la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión y la administración de la vacuna es simultánea.

25. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-24, caracterizado porque la vacuna es una
20 vacuna contra el cáncer.

26. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-25, caracterizado porque la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión comprende por lo menos 10^4 a 10^7 IU de la actividad de IL-2 por adulto o
25 por lo menos $10^5 \pm 100$ de la actividad de IL-2 por adulto

para aumentar una respuesta inmune.

27. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14-26, caracterizado porque el sujeto es un humano.

- 5 28. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14-26, caracterizado porque el sujeto es un mamífero domesticado o un mamífero agrícola.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan varios métodos y composiciones que se pueden emplear para modular el sistema inmune. Las composiciones incluyen una proteína de fusión que comprende:

5 (a) un primer polipéptido que comprende interleucina-2 (IL-2) o una variante funcional o fragmento de la misma; y (b) un segundo polipéptido, fusionado en el marco de lectura al primer polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende un dominio extracelular del receptor de interleucina 2 alfa

10 (IL-2R α) o una variante funcional o fragmento del mismo, y en donde la proteína de fusión tiene actividad de IL-2. Se proporcionan varios métodos para la modulación de la respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente

15 eficaz de la proteína de fusión de IL-2/IL-2R α descrita en este documento.