

MUTEÍNAS DERIVADAS DE LA INTERLEUCINA-2 HUMANA CON ACTIVIDAD SUPERAGONISTA

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con la rama de la Biotecnología, particularmente con una familia de proteínas mutadas (muteínas) derivadas de la Interleucina-2 (IL-2) humana, las cuales tienen una capacidad incrementada de unión a la cadena beta del receptor de la IL-2 y un perfil favorable de desarrollabilidad, que les confieren una potente actividad superagonista *in vitro* e *in vivo*.

ANTECEDENTES

Si bien la IL-2 fue descrita originalmente como un factor de crecimiento de las células T (Smith, K.A. Immunol. Rev. 51: 337-357, 1980), se conoce actualmente como un regulador con funciones duales en la respuesta inmune (Malek, T.R. Annu. Rev. Immunol. 26: 453-479, 2008; Hoyer K.K. y otros, Immunol. Rev. 226: 19-28, 2008), que promueve o modula negativamente las funciones efectoras del sistema inmune. Aunque la presencia constitutiva del receptor dimérico de afinidad intermedia beta/gamma en las células efectoras del sistema inmune media las potentes funciones inmunoestimuladoras de la IL-2, la existencia de altos niveles de la cadena alfa en la superficie de las células T reguladoras las dota de un receptor trimérico de alta afinidad, que permite la utilización preferencial de la citocina por esta población celular con respecto a otras células inmunes (Malek, T.R. y Castro, I. Immunity. 33: 153-165, 2010). Como consecuencia, en estado fisiológico el rol esencial de la IL-2 es el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (Malek, T.R. y Bayer, A.L. Nat. Rev. Immunol. 4: 665-674, 2004) a través de la estimulación de las células T reguladoras.

La dicotomía funcional de la IL-2 ha abierto amplias posibilidades para su explotación a fin de producir efectos terapéuticos contrapuestos sobre el sistema inmune y modular la respuesta inmune en uno u otro sentido en diferentes escenarios. Su uso en altas dosis ha evidenciado su capacidad inmunopotenciadora, útil para estimular respuestas anti-tumorales (Klapper, J.A. y otros, Cancer. 113: 293-301, 2008). Más allá de la manipulación farmacológica, la modificación por ingeniería de proteínas de la molécula

en sí misma ha conducido a la modulación selectiva de las interacciones con las distintas subunidades del receptor, y la consiguiente alteración del balance natural entre las funciones inmunoestimuladora e inmunorreguladora. Por ejemplo, se han descrito variantes mutadas de la IL-2 con propiedades superagonistas, en las que el incremento de la capacidad de unión a la subunidad beta conduce a la estimulación potente de las células efectoras T CD8+ y NK, y a un fuerte efecto antitumoral (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012). Al fortalecerse la interacción con el receptor dimérico beta/gamma presente en altos niveles en las células efectoras, disminuye la contribución relativa de la subunidad alfa característica de las células T reguladoras y por tanto, se crean moléculas con funciones sesgadas hacia la inmunopotenciación de la respuesta inmune. Estas muteínas, entre las cuales la más estudiada es la llamada superkina H9, provienen de la selección a partir de bibliotecas presentadas sobre la superficie de células de levadura (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012). Dicha plataforma tecnológica ha dominado los procedimientos de evolución *in vitro* de la IL-2 (Rao, B.M. y otros, Protein Eng. 16:1081-1087, 2003). A pesar de que la IL-2 se presentó sobre fagos filamentosos hace más de dos décadas (Buchli, P.J. y otros, Arch. Biochem. Biophys. 339: 79-84, 1997; Vispo, N.S. y otros, Immunotechnology. 3: 185-193, 1997), esta tecnología no ha sido útil hasta el momento para encontrar nuevos conjuntos de mutaciones que modulen las interacciones de la IL-2 con sus receptores.

La modificación de las propiedades funcionales de las citocinas mediante la introducción de mutaciones individuales o conjuntos discretos de ellas a menudo resulta en efectos deletéreos sobre la estabilidad y solubilidad de las moléculas, que tienen un impacto negativo en sus niveles de expresión como proteínas recombinantes, su perfil de desarrollabilidad como agentes terapéuticos, y finalmente sobre su actividad biológica. Estas limitaciones han conducido a enfoques más drásticos de rediseño *de novo* de agonistas estables a partir de la optimización extensiva *in silico* y la selección por afinidad a los receptores (Silva, D-A. y otros, Nature. 565: 186-191, 2019). Estas moléculas se alejan grandemente de la secuencia primaria de las citocinas naturales, por lo que su posible inmunogenicidad e interacciones no deseadas dentro del organismo son motivos de preocupación.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención definieron, a partir de la evolución dirigida de la Interleucina-2 humana presentada sobre fagos filamentosos, conjuntos discretos de mutaciones con regularidades no descritas anteriormente ni

predecibles a partir del análisis estructural de la IL-2 humana, cuya introducción aumenta la capacidad de la citocina de unirse a la subunidad beta de su receptor y por tanto de estimular a células del sistema inmune que portan el receptor dimérico de la IL-2. Las variantes de IL-2 así modificadas se distinguen de otros superagonistas descritos en el arte previo por una mejor desarrollabilidad en cuanto a niveles de expresión, baja tendencia a la agregación, y estabilidad térmica, que les confieren mayor capacidad superagonista y actividad anti-tumoral *in vivo*. Dicho hallazgo sienta las bases para la explotación de estas variantes a escala industrial para obtener productos terapéuticos, útiles en la inmunoterapia del cáncer, las inmunodeficiencias y en la estimulación *ex vivo* de células inmunes para protocolos de inmunoterapia adoptiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una realización la presente invención se basa en la identificación de conjuntos de mutaciones localizadas en las proximidades de la interfaz de unión con la cadena beta del receptor de la IL-2 a partir de bibliotecas de variantes de IL-2 humana presentadas sobre fagos filamentosos. La selección de fagos por afinidad al dominio extracelular recombinante de la cadena beta conduce al aislamiento de variantes con capacidad incrementada de unión al mismo. Los conjuntos de mutaciones identificados por esta vía son diversos, pero presentan regularidades que determinan las propiedades de las variantes seleccionadas. Particularmente se distinguen por la presencia de cambios en al menos dos de las posiciones 81, 83, 84 y 87 de la secuencia primaria de aminoácidos de la IL-2, que resultan en una carga negativa neta del segmento 81-87 igual o mayor a -2. Otro elemento distintivo de las mismas es la presencia preferentemente de la sustitución I92L o del residuo original Ile en la posición 92, sin otros sustituyentes en dicha posición. Las regularidades de las secuencias se muestran en la Tabla 1 (SEQ ID NO. 1-13).

Opcionalmente, se pueden mutar las posiciones 80 por los aminoácidos Phe, Val, Met o Ile, la posición 82 por Ala, la posición 85 por Ile, Val o Met, la posición 86 por Val, la posición 89 por Leu o Met. y la posición 93 por Ile o Leu (SEQ ID NO. 14-26).

En otra realización la presente invención comprende la construcción genética de nuevas moléculas recombinantes a través de la introducción de las mutaciones

anteriormente identificadas, solas o combinadas con las mutaciones K35E, K35D y K35Q (SEQ ID NO. 27-52) y/o con otras sustituciones conocidas por sus efectos sobre las propiedades de la IL-2 (SEQ ID NO. 127-152), y la fusión a los genes codificantes para proteínas de interés como los anticuerpos, sus dominios y fragmentos, albúmina, proteínas de la cápside de fagos filamentosos, citocinas y otras.

Son también objeto de la presente invención las proteínas recombinantes producidas a partir de las construcciones genéticas anteriormente descritas en sistemas de expresión en células hospederas procariotas como *E. coli* y eucariotas como HEK-293, CHO, NS0, células de insecto y levaduras. Estas proteínas poseen una capacidad incrementada de unión a la cadena beta del receptor, característica por la que fueron seleccionadas y que conduce a una potente actividad superagonista sobre células que portan el receptor dimérico beta/gamma de la IL-2. A diferencia de la superkina H9 y otras moléculas similares descritas en el arte previo, dichas muteínas se distinguen además por un perfil favorable de desarrollabilidad (altos niveles de expresión, baja tendencia a la agregación y elevada estabilidad térmica). El conjunto de las propiedades de las muteínas obtenidas como parte de la presente invención les confiere una mejor desarrollabilidad, y una mayor capacidad de estimulación de las células efectoras del sistema inmune y actividad anti-tumoral *in vivo*, en comparación con la IL-2 original y con la superkina H9.

Son también objeto de la presente invención las composiciones farmacéuticas que comprende las muteínas aquí descritas en un rango de concentración de 1 mg/ml a 20 mg/ml y un excipiente farmacéuticamente adecuado.

En otra realización es objeto de la presente invención el uso de las muteínas y las moléculas recombinantes derivadas de las mismas como fármacos para la inmunoterapia del cáncer, las inmunodeficiencias, y en la estimulación *ex vivo* de células inmunes para protocolos de inmunoterapia adoptiva.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la identificación de conjuntos de mutaciones en la secuencia de la IL-2 que se muestra en la Figura 1, a la cual se le introdujo el cambio C125S con respecto a la secuencia de la IL-2 salvaje (sombreado en gris). Estos

conjuntos de mutaciones se encuentran localizadas en las proximidades de la interfaz de unión de la IL-2 humana a la cadena beta de su receptor, y fueron seleccionadas a partir de bibliotecas sobre fagos filamentosos. Dichos conjuntos de mutaciones aumentan la capacidad de la citocina de unirse a la subunidad beta del receptor, y por tanto estimular a células del sistema inmune que portan el receptor dimérico de la IL-2. Se construyen proteínas recombinantes diversas derivadas de las variantes mutadas de la IL-2, que incluyen sustituciones adicionales y la fusión a otros dominios proteicos. Se demuestra que el perfil de desarrollabilidad de las moléculas así modificadas es favorable, debido a sus altos niveles de expresión, baja tendencia a la agregación y elevada estabilidad térmica, que les confieren mayor capacidad superagonista y actividad anti-tumoral *in vivo*. Se evidencia la superioridad de las propiedades de las nuevas muteínas sobre las moléculas recombinantes equivalentes, obtenidas en igual formato y sistema de expresión a partir de la IL-2 no mutada y de la superkina H9 ya conocida como parte del arte previo.

Selección de conjuntos de mutaciones que aumentan la interacción con la cadena beta del receptor a partir de bibliotecas de variantes de la IL-2 presentadas sobre fagos filamentosos.

La selección de polipéptidos derivados de la IL-2 humana, con mutaciones que conducen al incremento de su capacidad de unión a la subunidad beta del receptor puede realizarse a partir de bibliotecas de variantes de la IL-2 presentadas sobre fagos filamentosos. Los genes correspondientes a dichas variantes se insertan dentro de vectores de expresión de tipo fagomidio (fusionados a uno de los genes que codifica para las proteínas de la cápside de los fagos filamentosos) y se utilizan para la producción de partículas virales que exponen en su superficie las variantes proteicas. Las bibliotecas pueden incluir distintos grados de diversificación (aleatorización suave o fuerte) a lo largo de toda la secuencia o en un grupo de posiciones pre-definidas. Cada uno de los residuos originales en estas posiciones puede reemplazarse por una mezcla de los 20 aminoácidos o por un subgrupo de residuos escogidos. La diversificación puede lograrse a través de la mutagénesis al azar o sitio-dirigida.

La selección de los fagos con mayor capacidad de unión a la cadena beta se basa en la incubación de las mezclas de fagos provenientes de las bibliotecas sobre un soporte donde se inmoviliza una proteína recombinante que contiene el dominio extracelular de la subunidad beta del receptor de la IL-2, la eliminación de los fagos no unidos

mediante lavados, y la elución de los fagos unidos. Pueden realizarse varios ciclos de selección similares. El análisis de las secuencias de ADN insertadas en los fagomidios seleccionados revela regularidades que permiten identificar aquellas sustituciones más abundantes (y sus combinaciones) potencialmente relacionadas con el aumento de la capacidad de unión. Puede utilizarse el tamizaje de una biblioteca inicial para identificar puntos calientes que modulan la interacción, seguida por la exploración más fina de esos puntos y su vecindad a través de bibliotecas secundarias.

La capacidad de las variantes de interactuar con la subunidad beta puede evaluarse en ensayos de unión como el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) u otros similares con los fagos. Para segregar los efectos directos sobre la capacidad de unión a la cadena beta (que son los que se persiguen) de los posibles cambios en los niveles de presentación sobre fagos de las variantes de la IL-2, pueden normalizarse las señales obtenidas en el ensayo de unión, con respecto a las señales detectadas con una molécula que reaccione de manera equivalente con todas las variantes, como un anticuerpo dirigido contra un péptido etiqueta común fusionado a ellas.

Como resultado de los procesos selectivos se obtienen variantes diversas con secuencias diferentes, pero que cumplen ciertas regularidades. La primera es la presencia de mutaciones no silentes (con cambio del aminoácido codificado) en al menos dos de las posiciones seleccionadas dentro del grupo que comprende los residuos 81, 83, 84 y 87 de la secuencia primaria de la IL-2, que resultan en una carga negativa neta del segmento 81-87 igual o mayor que -2. Otra regularidad es la presencia frecuente de la mutación I92L (predominante), sin otros sustituyentes en dicha posición. Las diversas combinaciones de residuos que cumplen dichas regularidades se ilustran en la Tabla 1, que comprende trece clases de muteínas (SEQ ID NO. 113). Estos cambios pueden opcionalmente ir acompañados de otras modificaciones en las posiciones 80, 82, 85, 86, 89 y 93 (SEQ ID NO. 14-26). Dichas combinaciones de mutaciones conducen a una mayor reactividad de las variantes de IL-2 sobre fagos con la subunidad beta del receptor, en comparación con la IL-2 original.

Tabla 1. Regularidades de la secuencia primaria de las trece clases de variantes mutadas de la IL-2 humana identificadas como parte de la presente invención

Variantes de la IL-2	pos. 81	pos. 83	pos. 84	pos. 87	pos. 92	Carga neta (segmento 81-87)
Original (no mutada)	Arg	Arg	Asp	Ser	Ile	+1
Mutéínas de clase A (SEQ ID NO. 1)	aa grupo I (básicos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-2
Clase B (SEQ ID NO. 2)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo I (básicos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-2
Clase C (SEQ ID NO. 3)	aa grupo III (neutros)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-2
Clase D (SEQ ID NO. 4)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	Leu/Ile	-2
Clase E (SEQ ID NO. 5)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	Leu/Ile	-2
Clase F (SEQ ID NO. 6)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	aa grupo III (neutros)	Leu/Ile	-2
Clase G (SEQ ID NO. 7)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-2
Clase H (SEQ ID NO. 8)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-2
Clase I (SEQ ID NO. 9)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-3
Clase J (SEQ ID NO. 10)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-3
Clase K (SEQ ID NO. 11)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	Leu/Ile	-3
Clase L (SEQ ID NO. 12)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo III (neutros)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-3
Clase M (SEQ ID NO. 13)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	aa grupo II (ácidos)	Leu/Ile	-4

Las trece clases de variantes mutadas de la IL-2 que cumplen las regularidades identificadas como parte de la presente invención se denominan con las letras del alfabeto latino, desde la A hasta la M).

5

Los aminoácidos (aa) del grupo I (básicos) comprenden residuos Arg, Lys e His.

Los aa del grupo II (ácidos) comprenden los residuos Asp y Glu.

- 10 Los aa del grupo III (neutros) incluyen los residuos Ala, Asn, Gly, Gln, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr. Se excluye la Cys de los posibles sustituyentes.

Introducción de las mutaciones identificadas en proteínas recombinantes derivadas de la IL-2 y caracterización de sus propiedades de unión

Una vez identificados los conjuntos de mutaciones que conducen a un aumento de la interacción con la subunidad beta del receptor se introducen por mutagénesis sitio-dirigida en los genes codificantes de la IL-2 contenidos en distintos vectores de expresión diseñados para la modificación de células hospederas bacterianas, de levadura, o líneas celulares derivadas de insectos o de mamíferos (tanto plasmidios como vectores virales). Estos conjuntos de mutaciones pueden coincidir con las combinaciones de sustituciones aisladas directamente de la selección de fagos, pero también pueden diseñarse combinaciones nuevas entre ellas.

Puede adicionalmente introducirse en la posición 35 de la secuencia primaria de la IL-2 la sustitución por los aminoácidos E, D o Q (SEQ ID NO. 27-52), cuyo efecto beneficioso sobre los niveles de secreción, la resistencia a la agregación y la actividad biológica de moléculas derivadas de la IL-2 se conoce (WO2018/0910003; Rojas, G y otros, Sci. Reports. 9: 800, 2019). A partir de estas secuencias de las muteínas de IL-2 se pueden construir otras moléculas recombinantes a través de la fusión genética con proteínas como la albúmina, las regiones Fc y los dominios variables de los anticuerpos, anticuerpos completos y otras citocinas.

Las moléculas anteriormente descritas pueden obtenerse a partir de:

- a. la transformación de bacterias hospederas (como la *Escherichia coli*) o células de levadura con los plasmidios correspondientes.
- b. la transfección de células de insecto con plasmidios o vectores derivados de baculovirus.
- c. la transfección transitoria o estable de células hospederas como HEK-293, CHO, NS0 y otras derivadas de mamíferos con los plasmidios correspondientes, así como de la transducción de dichas células hospederas con vectores virales que contengan los genes de interés.

El aumento en la capacidad de unión de las muteínas a la subunidad beta del receptor puede demostrarse a través de métodos inmunoquímicos como el ELISA o de la medición de la resonancia de los plasmones de superficie (equipo BIAcore™). La capacidad de unión de las proteínas recombinantes derivadas de las variantes

mutadas descritas en la presente invención a la cadena beta del receptor de la IL-2, es mayor que la de la de sus contrapartes basadas en la IL-2 original.

Caracterización del perfil de desarrollabilidad de las muteínas y de las proteínas recombinantes derivadas de ellas

El conjunto de propiedades agrupadas bajo el término "perfil de desarrollabilidad" incluye características biofísicas como la tendencia a la agregación y la estabilidad térmica, así como los niveles de secreción de las proteínas de interés en distintos sistemas de producción de proteínas recombinantes. Todas ellas tienen una influencia directa en la factibilidad de desarrollar procesos productivos y obtener productos biológicos apropiados para su aplicación final.

La tendencia a la agregación se estudia por cromatografía de exclusión molecular que detecta la presencia y proporción de especies monoméricas y agregados de distinta talla. La existencia de agregados resistentes a la desnaturalización se demuestra mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

La estabilidad térmica se caracteriza a través de la comparación de las moléculas tratadas a altas temperaturas con sus contrapartidas sin tratar, para detectar el cambio de sus propiedades asociado al estrés térmico.

Los niveles de secreción pueden medirse en distintos sistemas de expresión basados en células hospederas genéticamente modificadas, con el uso de métodos que permitan cuantificar las moléculas secretadas en muestras de sobrenadante.

La cuantificación de las proteínas purificadas a partir de un volumen dado de sobrenadante permite determinar directamente los rendimientos.

Las variantes mutadas de la IL-2 humana descritas como parte de la presente invención y las moléculas recombinantes derivadas de ellas se distinguen por un perfil favorable de desarrollabilidad, caracterizado por mayores niveles de secreción como proteínas solubles a partir de las células hospederas, una menor tendencia a la agregación y una estabilidad térmica incrementada, en comparación con sus contrapartes que contienen la secuencia original de la IL-2 o la de la superkina H9. La presencia del cambio I92L se asocia con el mejoramiento de estas propiedades.

En contraposición, todas las variantes que contienen el cambio I92F, presente en la superkina H9 y en otras muteínas derivadas de la IL-2 con capacidad incrementada de unión a la cadena beta del receptor (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012; WO2020/260270 A1), muestran propiedades desfavorables de desarrollabilidad, como niveles disminuidos de secreción por las células hospederas, alta propensión a la agregación, y una pobre estabilidad térmica. La exclusión del cambio I92F de las muteínas reivindicadas como parte de la presente invención, y la introducción preferencial de un residuo de Leu en dicha posición son claves para la obtención del perfil favorable de desarrollabilidad que distingue a este grupo de muteínas y les confiere una ventaja sobre las moléculas con propiedades similares de unión a la cadena beta del receptor descritas como parte del arte previo.

Demostración del carácter superagonista de las muteínas sobre células que portan el receptor dimérico beta/gamma de la IL-2 *in vitro* e *in vivo*

La actividad superagonista de las nuevas moléculas se evidencia a través de la estimulación *in vitro* de células purificadas que expresan el receptor dimérico beta/gamma de la IL2, cuya proliferación se detecta por métodos de citometría de flujo.

Para demostrar el efecto *in vivo* de las muteínas sobre la expansión de poblaciones inmunológicas efectoras se tratan animales de experimentación con las muteínas y se monitorean las poblaciones de interés también por citometría de flujo.

Las proteínas recombinantes derivadas de las muteínas descritas como parte de la presente invención muestran una capacidad incrementada de estimular *in vitro* células portadoras del receptor dimérico de la IL-2 con respecto a las que contienen la IL-2 original y en una medida no inferior a la de la superkina H9. Su capacidad de estimular poblaciones celulares de este tipo *in vivo* supera tanto a la de las proteínas basadas en la IL-2 original como en la variante reportada H9.

Demostración del efecto anti-tumoral de las muteínas

El efecto anti-tumoral de las proteínas recombinantes derivadas de las muteínas puede demostrarse en modelos animales de tumores malignos. La administración de dichas proteínas a animales inoculados con líneas celulares de tumores trasplantables

singénicos puede evitar la formación de tumores, enlentecer el crecimiento tumoral o disminuir la formación de metástasis en diversos órganos.

Las proteínas recombinantes derivadas de las muteínas descritas como parte de la presente invención tienen efectos anti-tumorales como los descritos en modelos experimentales de tumores, en una magnitud superior a sus contrapartes que contienen la IL-2 original, e incluso superan en algunos sistemas experimentales a las que incluyen a la superkina H9 reportada en el arte previo.

10 Composiciones farmacéuticas

Las muteínas objeto de la presente invención se pueden encontrar como ingrediente activo, formando parte de diferentes composiciones farmacéuticas apropiadas para las mismas, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las concentraciones del ingrediente activo en dichas composiciones farmacéuticas se encuentran en el rango de 1 mg/ml a 20 mg/ml.

Entre los vehículos farmacéuticamente adecuados se incluyen, pero no se limitan a: solución salina, salina amortiguada con fosfato pH neutro, y otros parecidos. Otros agentes de amortiguación, agentes dispersos, y sustancias inertes no tóxicas apropiadas para entregar a un paciente podrán ser incluidas en las composiciones de la presente invención. Las composiciones podrán ser soluciones apropiadas para la administración, y son normalmente estériles y libres de partículas indeseables.

25 Aplicación terapéutica y métodos de tratamiento

Esta invención incluye además las posibles aplicaciones terapéuticas de las muteínas aquí descritas con el objetivo de potenciar la respuesta inmune natural o inducida por vacunas en enfermedades como el cáncer o inmunodeficiencias donde las células T efectoras sean particularmente relevantes. Además, se contempla el uso en la expansión *in vitro* de células T y NK para terapias de transferencia adoptiva.

Para su uso terapéutico, las muteínas de la presente invención deberán ser administrados a un sujeto portador de la enfermedad de forma independiente o combinado con otras muteínas o con otras sustancias que faciliten o potencien su acción terapéutica. La ruta de administración podrá ser cualquiera de las rutas de

administración descritas por el arte previo para la administración parenteral de fármacos. Podrá administrarse preferiblemente por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratumoral.

- 5 Las muteínas de la presente invención pueden ser usadas en combinación con vacunas terapéuticas para cáncer.

Para obtener el efecto terapéutico deseado, las muteínas de la presente invención deberán ser administradas a dosis suficientemente altas como para garantizar una
10 concentración de las mismas en el nodo linfático o sitio periférico relevante para la enfermedad en estudio, que esté en el rango de concentraciones para el cual las muteínas muestran un efecto immune-estimulador. La dosis en cuestión deberá por tanto ser ajustada para el tipo de enfermedad y vía de administración en estudio. Por ejemplo en el caso de terapia de tumores, la dosis debe ajustarse para lograr
15 concentraciones de la muteína en el interior del tumor y/o en el nodo linfático loco-regional que garanticen la estimulación de una respuesta inmune antitumoral. Los rangos de dosis a explorar pueden abarcar desde 20 µg/Kg de peso hasta 200 µg/Kg de peso. Para aquellas aplicaciones en que la muteína sustituya una terapia tradicional con IL-2 nativa, la dosis de muteína a utilizar debe ser menor o equivalente en actividad
20 (determinada usando ensayo con línea CTLL-2) a la usada tradicionalmente para la IL-2 nativa.

El número de administraciones a aplicar deberá también ajustarse a la biodistribución de la muteína en cuestión. En general se deberá lograr sostener las concentraciones
25 efectivas antes referidas por un tiempo que va desde 2 días hasta 30 días consecutivos. Note por ejemplo que si la muteína es acoplada a una proteína transportadora, la frecuencia de administraciones puede disminuir y la dosis de la misma deberá ser ajustada en consecuencia; en este caso el rango de dosis varía desde 100 µg/Kg de peso hasta 1mg/Kg de peso. Para aplicaciones donde se sustituya
30 a la IL-2 nativa, el esquema de administración de la muteína podrá ser similar al aplicado en la terapia tradicional.

Debe entenderse por acción terapéutica la remisión total o parcial de los síntomas de la enfermedad. En cáncer, la disminución del volumen tumoral o el incremento del
35 tiempo de recaída será, entre otros, el criterio de remisión de la enfermedad.

Los polipéptidos de la invención son particularmente útiles en la terapia de tumores tales como entre otros melanomas, tumores renales, tumores de ovario, mama y pulmón. También pueden ser útiles en inmunodeficiencias como el VIH y la inmunodeficiencia severa combinada.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Secuencia primaria de aminoácidos de la IL-2 original (T3-T133) tomada como base para la construcción de las muteínas sobre fagos filamentosos.

Figura 2. Secuencias de los segmentos modificados (12-23 y 81-87) en la biblioteca de aleatorización suave de la interfaz de la IL-2 con la subunidad beta del receptor.

Figura 3. Representación del perfil global de secuencias aisladas de la biblioteca S1 después de la selección de fagos sobre el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor.

Figura 4. Cargas del segmento 81-87 en las variantes seleccionadas de la biblioteca S1.

Figura 5. Capacidad incrementada de unión de la mezcla de fagos seleccionados de la biblioteca S1.

Figura 6. Secuencias del segmento modificado (80-93) de la IL-2 en los clones seleccionados a partir de la biblioteca S2.

Figura 7. Reactividad determinada por ELISA de las variantes de IL-2 sobre fagos filamentosos seleccionadas a partir de la biblioteca S2.

Figura 8. Secuencia primaria de aminoácidos de la IL-2 (A1-T133).

Figura 9. Rendimiento de las proteínas fusionadas al Fc humano en el sistema de transfección transitoria de células HEK-293T adaptadas a crecer en suspensión.

35

Figura 10. Productividad de los clones estables productores de proteínas de fusión de las muteínas de IL-2 al Fc de IgG1 humana.

Figura 11. Capacidad de unión de las proteínas de fusión al Fc humano derivadas de las muteínas de IL-2 seleccionadas a partir de la biblioteca S1 a la cadena beta del receptor.

Figura 12. Capacidad de unión de las proteínas de fusión al Fc humano derivadas de las muteínas de IL-2 seleccionadas a partir de la biblioteca S2, a la cadena beta del receptor.

Figura 13. Reactividad relativa frente a la cadena beta después de un tratamiento de las proteínas de fusión a 50°C.

Figura 14. Expansión *in vivo* de la población de células T efectoras activadas (CD8+CD44hi CD122hi). Se muestra el número de células en cada ratón.

Figura 15. Expansión *in vivo* de la población de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+). Se muestra el número de células en cada ratón.

Figura 16. Efecto anti-metastásico de las proteínas de fusión al Fc humano LALA que contienen a las muteínas de IL-2.

Figura 17. Efecto anti-metastásico de las proteínas de fusión que contienen muteínas combinadas con capacidad de unión incrementada a la cadena beta del receptor y disminuida con la cadena alfa en el modelo MB16/F0.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción de una biblioteca de aleatorización suave de la interfaz de la IL-2 humana sobre fagos filamentosos con la subunidad beta del receptor de la IL-2 y selección de variantes mutadas a partir de ella

Para la identificación inicial de posiciones que modulen la interacción de la IL-2 con la subunidad beta del receptor se utilizó, a diferencia de la diversificación al azar

empleada en trabajos anteriores (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012), una estrategia de aleatorización suave focalizada en la interfaz de interés. Como base se utilizó la construcción genética descrita (Rojas, G. y otros, Immunobiology 218: 105-113, 2013; Rojas, G. y Carmenate, T., Methods Mol. Biol. 1701: 535-560, 2018) que contiene el gen codificante para la IL-2 humana (residuos T3-T133, C125S, Figura 1) fusionado al gen de la proteína III del bacteriófago filamentoso M13. La biblioteca de 7×10^7 miembros se construyó por mutagénesis de Kunkel (Kunkel, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, 1985) con dos oligonucleótidos mutagénicos degenerados antisentido. Los oligonucleótidos introdujeron variabilidad limitada en 14 posiciones (siete en cada uno de los segmentos aminoacídicos 12-23 y 81-95 de la IL-2) (Figura 2). Los residuos a mutar se escogieron debido a su ubicación en la interfaz con la cadena beta ($< 5\text{\AA}$) en la estructura del complejo IL-2/receptor (código PDB 2B5I). Estos oligonucleótidos incluyeron el 90% del nucleótido complementario al original en cada posición de los tripletes a diversificar, y el 10% restante de una mezcla de los otros tres nucleótidos.

Se produjeron los fagos de la biblioteca según un protocolo descrito (Marks, J.D. y otros, J. Mol. Biol. 222: 581–597, 1991), y se seleccionaron los fagos con capacidad de unión a la superficie de inmunotubos recubiertos con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta humana. La secuenciación de una muestra de los fagomidios obtenidos después de tres ciclos de selección evidenció la presencia de variantes mutadas como se evidencia en la Figura 2. En la primera línea de dicha Figura aparece la IL-2 original (con los residuos a modificar sombreados en gris), y debajo las variantes aisladas después de tres ciclos de selección. Los guiones indican la conservación del residuo original de la IL-2 en una posición dada. Entre paréntesis se muestra la frecuencia de cada variante en la muestra de 41 clones analizados después de la selección. El asterisco (*) representa la existencia de otras mutaciones fuera de la región modificada intencionalmente.

Los aminoácidos que exhibieron una mayor frecuencia de mutaciones en este panel fueron R81 (sustituida preferentemente por D), I92 (I92L) y S87 (S87D). Estas tres posiciones se escogieron como puntos calientes que modulan la interacción con la subunidad beta del receptor.

Ejemplo 2. Exploración combinatoria de la vecindad de los puntos calientes identificados a través de bibliotecas secundarias sobre fagos

Se construyeron dos bibliotecas secundarias (S1 y S2) por técnicas similares a las descritas en el ejemplo anterior. La biblioteca S1 incluyó la aleatorización total de los puntos calientes R81 y S87 y de los residuos vecinos (también expuestos al solvente) R83 y D84, así como la sustitución del residuo adyacente P82 por la mezcla Pro/Ala.

5

La biblioteca S2 incluyó, además de las modificaciones anteriores, el reemplazo de los residuos I92 (punto caliente) y otros aminoácidos del núcleo hidrofóbico cercano a la interfaz con la cadena beta (L80, L85, I86, I89 y V93), por una mezcla de residuos hidrofóbicos (Phe/Ile/Met/Leu/Val).

10

Si bien los trabajos precedentes habían abordado la diversificación del núcleo hidrofóbico de la IL-2 (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012), la aleatorización de residuos protuberantes altamente expuestos al solvente para modular positivamente la interacción de la IL-2 con la cadena beta es novedosa.

15

La secuenciación de una muestra de clones obtenidos de la biblioteca S1, después de tres ciclos de selección sobre inmunotubos recubiertos con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor, evidenció una amplia diversidad. Se encontraron 48 secuencias únicas (SEQ ID NO. 53-100), ninguna repetida más de tres veces, pero que cumplían ciertas regularidades como se muestra en la Figura 3, donde las letras representan los aminoácidos codificados en cada posición del segmento 81-87. El tamaño de cada letra es proporcional a la frecuencia de aparición del residuo correspondiente en una posición dada.

20

25

Los residuos básicos de Arg de las posiciones 81 y 83 resultaron reemplazados por varios aminoácidos, entre ellos Asp y Glu (ácidos). En la mayoría se conservó el carácter ácido del residuo D84, sustituido preferentemente por Glu. El aminoácido S87 fue reemplazado frecuentemente tanto por Glu como por Asp. Este patrón de selección reveló la posible importancia de la acumulación de cargas negativas en el segmento 81-87 de la IL-2 para el aumento de la interacción con la cadena beta. Mientras que la IL-2 tiene una carga positiva neta (+1) en esta zona y la carga de la variante H9 descrita en el arte previo es -1, entre las nuevas variantes seleccionadas a partir de la biblioteca S1 predominaron las variantes con cargas negativas netas de -2 y -3 en el segmento 81-87, pese a que ese segmento en la biblioteca sin seleccionar era mayormente neutro debido a la aleatorización (Figura 4).

30

35

La reactividad de las mezclas de fagos obtenidas después de dos y tres ciclos de selección se evaluó mediante ELISA sobre placas recubiertas con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor y con la proteína no relacionada albúmina sérica bovina. Los fagos unidos se detectaron con un anticuerpo anti-fago conjugado a peroxidasa de rábano picante. Como controles se utilizaron los fagos que presentaban la IL-2 original no mutada y su variante H9 (superkina). El resultado funcional de la selección fue un incremento de la reactividad con la cadena beta de la mezcla de fagos (Figura 5).

En la Figura 6 se muestran las secuencias obtenidas (SEQ ID NO. 100-112) después de tres ciclos de selección de los fagos de la biblioteca S2 sobre el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor. En la primera línea aparece la IL-2 original de partida (con los residuos diversificados sombreados en gris), y debajo las variantes aisladas después de tres ciclos de selección sobre el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor inmovilizado. Los guiones indican la conservación del residuo original de la IL-2 en una posición dada. Entre paréntesis se muestra la cantidad de veces que cada variante se repitió dentro de la muestra de 54 clones analizada. Los números al final de cada línea representan la carga neta del segmento 81-87 en cada variante seleccionada.

Como se muestra en la Figura 6 se obtuvieron doce secuencias diversas (SEQ ID NO. 100-112), con diferente abundancia relativa. Las variantes seleccionadas se distinguieron por la presencia mayoritaria de la sustitución I92L; la desaparición de los residuos originales de Arg en las posiciones 81 y 83; el hallazgo frecuente de residuos ácidos en las posiciones 81, 83 y 87; y la conservación del carácter ácido del residuo D84 (solamente sustituido por Glu). Este patrón de secuencias resultó en una carga negativa neta considerable (-2 o mayor) en el segmento 81-87. Los datos anteriores reforzaron la importancia de las interacciones electrostáticas para optimizar la unión a la subunidad beta. Si bien hubo coincidencias entre las secuencias seleccionadas a partir de la biblioteca S2 y la superkina H9 descrita en el arte previo (la aparición eventual de los cambios L80F, R81D, L85V e I86V), existieron diferencias marcadas entre ellas. Las secuencias aisladas de la biblioteca S2 incluyeron mayoritariamente el cambio I92L, en contraposición con la mutación I92F presente en la H9. Esta última conserva la R83, mientras que en las nuevas variantes este residuo está sustituido. La S87 se conserva también en la H9, pero está frecuentemente reemplazada por aminoácidos ácidos en las nuevas variantes, La carga neta del segmento 81-87 es

más negativa en las variantes de la biblioteca (-2, -3) que en La H9 (-1). Los resultados demostraron la posibilidad de obtener variantes de la IL-2 humana con una capacidad incrementada de unión a la cadena beta a través de soluciones estructurales diversas y diferentes a la de la H9.

5

Se evaluó la capacidad de unión de las nuevas variantes al dominio extracelular de la subunidad beta del receptor de la IL-2 mediante ELISA. Para ello se recubrieron las placas con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor de la IL-2. Los fagos unidos se detectaron con un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante. Simultáneamente se determinó su unión a una placa recubierta con el anticuerpo monoclonal 9E10 dirigido contra el péptido *c-myc* que está fusionado a las proteínas presentadas sobre los fagos, para establecer el nivel de presentación de cada una. Se representa la relación entre las señales obtenidas con ambos recubrimientos (reactividad relativa) como medida de la capacidad intrínseca de unión de cada variante a la subunidad beta. Como controles se utilizaron la IL-2 original y la superkina H9, también presentadas sobre fagos.

10

15

En la Figura 7 se observa una mayor capacidad de unión de estas variantes con respecto a la IL-2 humana y en algunos casos también a la H9 presentada sobre fagos.

20

Ejemplo 3. Diseño de proteínas de fusión derivadas de las nuevas variantes de IL-2 y producción por transfección transitoria

25

30

35

La caracterización de las variantes seleccionadas sobre fagos como proteínas solubles se realizó en el formato de proteínas de fusión al extremo N-terminal de una región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO. 113). El sistema de expresión elegido fue la transfección transitoria de células HEK-293T adaptadas a crecer en suspensión (Jäger y otros, BMC Biotechnol. 13: 52, 2013). Para la producción en hospederos eucariotas se adicionaron los dos primeros aminoácidos (Ala-Pro) de la IL-2, ausentes en las moléculas presentadas sobre fagos, y se introdujo la mutación K35E, con un efecto beneficioso demostrado sobre la desarrollabilidad de la IL-2 (Rojas, G. y otros, Sci. Reports. 9: 800, 2019). La Figura 8 muestra la secuencia primaria de la IL-2 tomada como base para la producción en células eucariotas, a la cual se le introdujeron los cambios pertinentes en la interfaz con la cadena beta. Dichos cambios se diseñaron a partir de los resultados del tamizaje de la biblioteca inicial de aleatorización suave de la interfaz y de las bibliotecas secundarias S1 y S2.

A partir de los productos de la biblioteca S1 se diseñaron dos proteínas de fusión con mutaciones frecuentemente seleccionadas (R81D/R81V, R83Q/R83E y S87E) y una carga negativa neta de -3 en el segmento 81-87. Estas variantes se mencionan en lo adelante como $_{81}\text{DPQDLIE}_{87}$ (SEQ ID NO. 114) y $_{81}\text{VPEDLIE}_{87}$ (SEQ ID NO. 115) por su secuencia primaria en este segmento. En ellas se mantuvo la Ile original en la posición 92. La introducción del cambio adicional I92L (seleccionado repetidamente desde el tamizaje inicial de la biblioteca de aleatorización suave) dio lugar a otras dos proteínas de fusión: $_{81}\text{DPQDLIE}_{87} + \text{I92L}$ (SEQ ID NO. 116) y $_{81}\text{VPEDLIE}_{87} + \text{I92L}$ (SEQ ID NO. 117).

Entre las moléculas seleccionadas de la biblioteca S2 se escogieron las variantes presentadas sobre fagos 1A y 2B, debido a su alta reactividad frente a la cadena beta, su presencia recurrente entre los clones seleccionados y la carga negativa neta de -2 en el segmento 81-87. A partir de ellas se construyeron dos proteínas de fusión, mencionadas en lo adelante como $_{80}\text{FDPHDVVE}_{87} + \text{I92L} + \text{V93L}$ (SEQ ID NO. 118) y $_{80}\text{VPPEDLIA}_{87} + \text{I92L}$ (SEQ ID NO. 119) respectivamente por su secuencia en la interfaz con la cadena beta.

La variante $_{80}\text{VPPEDLIA}_{87} + \text{I92L}$ (SEQ ID NO. 119) no comparte ninguna mutación con la superkina H9, por lo que representa una nueva solución estructural para el aumento de interacción con la subunidad beta. Con la intención de optimizarla se diseñó otra variante ($_{80}\text{VPPEDLIE}_{87} + \text{I92L}$) (SEQ ID NO. 120), que incorpora además la mutación S87E, que fue seleccionada frecuentemente de la biblioteca e incrementa la carga negativa neta de la interfaz (-3).

Por el contrario, la secuencia de otros clones seleccionados de la biblioteca S2 sí se solapa con la de la superkina H9, por lo que se exploró como posible vía de optimización la combinación de los cambios presentes en la H9 con los rasgos distintivos nuevos de las variantes seleccionadas a partir de nuestras bibliotecas. Se mantuvieron así los cambios L80F, R81D, L85V y I86V de la H9 (también seleccionados a partir de la biblioteca de fagos), pero se sustituyó la R83 por Ala o Glu (ambas frecuentemente seleccionadas de la biblioteca de fagos) y se introdujo el cambio S87E (mutación recurrente entre las nuevas variantes). Como la posición 92 en la H9 está ocupada por un residuo de Phe y en las variantes seleccionadas se encontró mayoritariamente el cambio I92L, se evaluaron ambos residuos (Phe y Leu) en esta posición. Las variantes diseñadas y construidas fueron:

80FDPADVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 121)

80FDPADVVE₈₇+I92F (SEQ ID NO. 125)

80FDPEDVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 122)

80FDPEDVVE₈₇+I92F (SEQ ID NO. 126)

5

La Figura 9 ilustra los rendimientos en términos de masa de la purificación por afinidad a proteína A partiendo de 1L de sobrenadante de cultivo de las distintas proteínas de fusión en un experimento de transfección transitoria de células HEK-293T en suspensión. Resultaron llamativos los niveles disminuidos de secreción de las proteínas de fusión que contienen a la superkina H9 (30 mg/L de sobrenadante), así como de las otras dos muteínas diseñadas que incluyen en su secuencia el cambio I92F (<33 mg/L). Por el contrario, el resto de las muteínas diseñadas a partir de los resultados del tamizaje de las bibliotecas sobre fagos se produjeron a mayores niveles (>67 mg/L). Este resultado fue una primera evidencia del perfil favorable de desarrollabilidad asociado a las nuevas muteínas, y sugirió el efecto deletéreo de la mutación I92F presente en la superkina H9 sobre la producción de las mismas.

Ejemplo 4. Producción estable de las proteínas de fusión basadas en las muteínas de IL-2 a partir de la transducción lentiviral de células HEK-293 adaptadas a crecer en suspensión

El clonaje de los *cassettes* de expresión de las construcciones genéticas utilizadas para la transfección transitoria en el vector lentiviral pL6WBlast permitió la generación de clones estables productores de un subgrupo de las proteínas de fusión descritas en el ejemplo anterior:

80VPPEDLIA₈₇+I92L (SEQ ID NO. 119)

80VPPEDLIE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 120)

80FDPADVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 121)

80FDPEDVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 122)

Los clones se obtuvieron por transducción lentiviral de células HEK-293 adaptadas a crecer en suspensión con las construcciones genéticas de interés derivadas del vector pL6WBlast. Se incluyeron en el estudio los cinco mejores clones productores de cada variante. La concentración de proteína de fusión en los sobrenadantes se determinó por ELISA en placas de microtitulación recubiertas con un anticuerpo anti-IL-2. Las

proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa de rábano picante. Se utilizó como patrón una preparación de la proteína de fusión IL-2/Fc (K35E). Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una cola, seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

5

La Figura 10 ilustra la productividad de los clones obtenidos. A pesar de la heterogeneidad entre los clones, presumiblemente debida a las diferencias en la localización y multiplicidad de la integración del ADN foráneo en el genoma de las células hospederas, se observó una clara superioridad de los clones productores de las proteínas de fusión que contienen a las nuevas muteínas con respecto a los que producen la que incluyen a la superkina H9. Una de las variantes (₈₀FDPEDVVE₈₇+I92L) (SEQ ID NO. 122) se produce incluso mejor que el resto. Estos datos reafirmaron la idea de un perfil favorable de desarrollabilidad asociado a las nuevas variantes.

15

Ejemplo 5. Demostración de la capacidad incrementada de unión a la cadena beta y la baja tendencia a la agregación de las proteínas de fusión que contienen las nuevas muteínas

Las proteínas de fusión (a 60 ng/mL), purificadas a partir del sobrenadante de células HEK-293-T adaptadas a crecer en suspensión y transfectadas con las construcciones genéticas correspondientes, se incubaron sobre placas de ELISA recubiertas con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor, y se detectaron con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a peroxidasa de rábano picante. Las proteínas de fusión derivadas de las nuevas muteínas se designan según las secuencias que contienen en su interfaz con la cadena beta (segmentos 81-87 y posición 92). Como controles se utilizaron proteínas de fusión derivadas de la IL-2 original y de la superkina H9.

25

La primera generación de proteínas de fusión (derivadas del tamizaje de la biblioteca S1) mostró una capacidad incrementada de unión al dominio extracelular de la subunidad beta del receptor con respecto a su contrapartida que contiene a la IL-2 original (Figura 11), en el mismo rango que la de la proteína de fusión basada en la superkina H9. La introducción del cambio I92L en estas moléculas no tuvo un impacto adicional en la capacidad de unión a la subunidad β del receptor.

35

El perfil de cromatografía de exclusión molecular de las variantes $_{81}$ DPQDLIE $_{87}$ (SEQ ID NO. 114) y $_{81}$ VPEDLIE $_{87}$ (SEQ ID NO. 115) reveló la presencia de un pico mayoritario correspondiente al homodímero esperado de acuerdo a la capacidad de dimerización específica del fragmento Fc (92-95%), acompañado de al menos un pico minoritario de agregados de alta talla molecular (Tabla 2). Para las versiones de estas proteínas de fusión que incluyen el cambio I92L ($_{81}$ DPQDLIE $_{87}$ +I92L (SEQ ID NO. 116) y $_{81}$ VPEDLIE $_{87}$ +I92L) (SEQ ID NO. 117) no fueron evidentes los agregados y prácticamente la totalidad de la proteína (>98%) se encontró en su forma homodimérica. A pesar de estas diferencias y de la influencia positiva de la mutación I92L, todas las proteínas de fusión basadas en las nuevas muteínas presentaron una baja tendencia a la agregación en comparación con su contrapartida basada en la superkina H9, que se encontró mayoritariamente en forma de agregados de alta talla (Tabla 2).

Tabla 2. Estado de agregación de las proteínas de fusión a Fc humano derivadas de las muteínas de primera generación

Proteína de fusión	Proporción de homodímeros no agregados (%)
IL-2/Fc (K35E)	90,2
H9/Fc)K35E)	38
$_{81}$ DPQDLIE $_{87}$ (SEQ ID NO. 114)	94,1
$_{81}$ VPEDLIE $_{87}$ (SEQ ID NO. 115)	92,6
$_{81}$ DPQDLIE $_{87}$ +I92L (SEQ ID NO. 116)	99,2
$_{81}$ VPEDLIE $_{87}$ +I92L (SEQ ID NO. 117)	98,6

La segunda generación de proteínas de fusión (derivadas del tamizaje de la biblioteca S2) tuvo un comportamiento heterogéneo en cuanto a niveles de agregación. Mientras que las dos moléculas que incluyen por diseño el cambio I92F mostraron un patrón complejo de agregación indeseada y una proporción minoritaria del homodímero no agregado (Tabla 3), las proteínas de fusión que contienen las muteínas seleccionadas directamente de la biblioteca y las diseñadas que incluyen un residuo de Leu en la posición 92 tuvieron una tendencia muy baja a la agregación (> 95% de producto purificado homodimérico) (Tabla 3).

Tabla 3. Estado de agregación de las proteínas de fusión a Fc humano derivadas de las muteínas de segunda generación

Proteína de fusión	Proporción de homodímeros no agregados (%)
80FDPADVVE₈₇+I92F (SEQ ID NO. 125)	31,6
80FDPEDVVE₈₇+I92F (SEQ ID NO. 126)	2,5
80FDPHVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 118)	97,8
80VPPEDLIA₈₇+I92L (SEQ ID NO. 119)	97,2
80VPPEDLIE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 120)	97,7
80FDPADVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 121)	97,5
80FDPEDVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 122)	95,6

Las dos proteínas de fusión con alta tendencia a la agregación, que ya se habían distinguido del resto por sus niveles menores de secreción (Ejemplo 3) fueron excluidas de los análisis posteriores. El resto de las proteínas de fusión, purificadas a partir del sobrenadante de células HEK-293-T adaptadas a crecer en suspensión y transfectadas con las construcciones genéticas correspondientes y a una concentración de 30ng/mL, se incubaron sobre placas de ELISA recubiertas con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor, y se detectaron con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a peroxidasa de rábano picante. Como controles se utilizaron proteínas de fusión derivadas de la IL-2 original y de la superkina H9.

Las muteínas de segunda generación analizadas, además de su baja tendencia a la agregación, mostraron una capacidad incrementada de unión a la cadena beta, superior en al menos un 50% en ELISA a la de la proteína basada en la superkina H9 (Figura 12).

Este resultado se corroboró a través de la medición de la afinidad y los parámetros cinéticos de la interacción con la subunidad beta por BIAcore™ (Tabla 4). Las proteínas de fusión derivadas de las muteínas descritas en la presente invención tuvieron una mayor afinidad que las que comprenden a la IL-2 no mutada (reducción de la constante de equilibrio de disociación K_D en más de 90 veces con respecto a ella) y a la superkina H9 (reducción de más de 3 veces en la K_D). Este incremento se debió

a una cinética de asociación (k_{on}) más rápida, unida a una disminución en la constante de velocidad de disociación k_{off}).

Tabla 4. Medición por BIAcore™ de las constantes de equilibrio y parámetros cinéticos de la interacción con la cadena beta del receptor de las proteínas de fusión que contienen muteínas derivadas de la IL-2

Proteína de fusión	k_{on} (L/mol s)	k_{off} (1/s)	K_D (nmol/L)
IL-2/Fc(K35E)	$3.082 \pm 0.218 \times 10^4$	$3.256 \pm 0.363 \times 10^{-3}$	105.90 ± 12
H9/Fc(K35E)	$9.724 \pm 0.734 \times 10^4$	$3.946 \pm 1.149 \times 10^{-4}$	4.09 ± 1
⁸⁰FDPHVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 118)	$2.385 \pm 0.206 \times 10^5$	$2.660 \pm 0.184 \times 10^{-4}$	1.12 ± 0.02
⁸⁰VPPEDLIA₈₇+I92L (SEQ ID NO. 119)	$4.357 \pm 0.339 \times 10^5$	$3.493 \pm 0.713 \times 10^{-4}$	0.80 ± 0.2
⁸⁰VPPEDLIE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 120)	$8.161 \pm 0.195 \times 10^5$	$3.039 \pm 0.806 \times 10^{-4}$	0.37 ± 0.1
⁸⁰FDPADVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 121)	$8.584 \pm 0.115 \times 10^5$	$4.605 \pm 0.57 \times 10^{-4}$	0.54 ± 0.1
⁸⁰FDPEDVVE₈₇+I92L (SEQ ID NO. 122)	$9.458 \pm 0.351 \times 10^5$	$2.732 \pm 0.683 \times 10^{-4}$	0.29 ± 0.1

Las proteínas purificadas se incubaron a 50°C durante 48 y 72h, antes de evaluarlas por ELISA sobre placas de microtitulación recubiertas con el dominio extracelular recombinante de la subunidad beta del receptor. Las proteínas unidas se detectaron con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a peroxidasa de rábano picante. Se calculó la reactividad relativa de cada proteína tratada tomando como referencia (100%) la reactividad de la misma proteína sin tratar. Se incluyó como control la proteína de fusión basada en la superkina H9.

En la Figura 13 se observa como las muteínas objeto de la presente invención tienen una mayor estabilidad térmica, evidenciada por la conservación de la capacidad de unión de las proteínas de fusión correspondientes a la cadena beta en más de un 82%. Dicho resultado contrasta con la pérdida drástica de reactividad (mayor del 76%) de la proteína de fusión que contiene a la superkina H9 al ser sometida a condiciones similares.

Los resultados anteriores demuestran, en su conjunto, que la incorporación de las mutaciones seleccionadas de nuestras bibliotecas de fagos, le confieren a la IL-2 y las proteínas recombinantes derivadas de ella una capacidad incrementada de unión a la

subunidad beta, unida a un perfil favorable de desarrollabilidad en términos de niveles de expresión, baja propensión a la agregación y alta estabilidad térmica. Este último grupo de propiedades representa una ventaja sustancial con respecto a las moléculas similares descritas en el arte previo (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012).

Ejemplo 6. Demostración de la capacidad superagonista *in vitro* e *in vivo* de las nuevas muteínas sobre células que presentan el receptor dimerico beta/gamma de la IL-2

Para estudiar el efecto *in vitro* de las proteínas de fusión basadas en las muteínas de IL-2 fusionadas a Fc humano, se purificaron células T CD8+ a partir de ratones no inmunizados y se marcaron con CTV. Se estimularon con cada una de las proteínas de fusión en estudio y se evaluó por citometría de flujo la disminución de la fluorescencia en las células, como un indicador de capacidad de las proteínas de inducir la proliferación de esta población celular. Se utilizaron como controles células no estimuladas y células tratadas con las proteínas de fusión que contienen a la IL-2 original y a la superkina H9.

Las proteínas de fusión que contienen a las cuatro nuevas muteínas de la IL-2 estudiadas indujeron la proliferación del 93-96% de las células T CD8+, con un comportamiento similar al de la proteína basada en la superkina H9 (Tabla 5). Por el contrario, la proteína de fusión de la IL-2 al Fc humano tuvo un efecto moderado, solo indujo la proliferación del 55,3% de las células. Estos resultados demostraron la capacidad superagonista *in vitro* de las nuevas variantes sobre células que portan el receptor dimérico beta/gamma de la IL-2.

Tabla 5. Expansión in vitro de células T CD8+ inducida por las proteínas de fusión que contienen a las muteínas de IL-2

Proteína de fusión	Proporción de células T CD8+purificadas en proliferación (%)
IL-2/Fc (K35E)	55,3
H9/Fc (K35E)	94,0
⁸⁰ VPPEDLIA ₈₇ +I92L (SEQ ID NO. 119)	94,3
⁸⁰ VPPEDLIE ₈₇ +I92L (SEQ ID NO. 120)	93,5
⁸⁰ FDPADVVE ₈₇ +I92L (SEQ ID NO. 121)	94,5
⁸⁰ FDPEDVVE ₈₇ +I92L (SEQ ID NO. 122)	95,9

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron versiones de las proteínas de fusión que contenían el FcLALA (con las mutaciones L234A y L235A) (SEQ ID NO. 123) para evitar su unión a los receptores Fc gamma y la ocurrencia de efectos inmunológicos mediados por estos más allá de la acción de las muteínas. Estas nuevas proteínas de fusión se designaron como:

⁸⁰VPPEDLIA₈₇+I92L/LALA (SEQ ID NO. 119)

⁸⁰VPPEDLIE₈₇+I92L/LALA (SEQ ID NO. 120)

⁸⁰FDPADVVE₈₇+I92L/LALA (SEQ ID NO. 121)

⁸⁰FDPEDVVE₈₇+I92L/LALA (SEQ ID NO. 122)

A diferencia del escenario anterior, los experimentos de estimulación *in vivo* evidenciaron un mayor efecto de las proteínas de fusión basadas en las nuevas muteínas, en comparación con su contrapartida que contiene a la superkina H9. Después de un tratamiento diario durante cuatro días consecutivos de cada grupo de animales con 5,6 µg por vía intraperitoneal de cada una de las proteínas de fusión, al quinto día se sacrificaron los ratones, se extrajeron sus bazo, se maceraron y se analizaron las células por citometría de flujo. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una cola, seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey (p<0.05).

La cantidad de linfocitos T CD8+ activados (CD8+CD44hiCD122hi) aumentó significativamente en los grupos tratados con las proteínas de fusión que contienen a las nuevas muteínas, en comparación con los animales tratados con la IL-2/Fc7LALA, la H9/FcLALA y el grupo control que solo recibió solución salina tamponada por fosfatos (PBS) (Figura 14).

Por el contrario, la población de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+), si bien se expandió en los animales tratados con todas las proteínas de fusión con respecto a los del grupo control, no mostró diferencias entre los animales que recibieron las nuevas proteínas de fusión (Figura 15) y los que fueron inoculados con las proteínas IL-2/Fc y H9/Fc utilizadas como controles. Estos resultados demuestran la ventaja selectiva de las nuevas muteínas con afinidad incrementada por la subunidad beta del receptor para la activación *in vivo* de las células efectoras del sistema inmune que portan el receptor dimérico beta/gamma, con respecto a la IL-2 y a la superkina H9 descrita en el arte previo. Su mayor potencial efector no va acompañado de un

aumento en la función reguladora, por lo que el balance neto debe potenciar las funciones efectoras del sistema inmune.

Estos resultados demuestran la ventaja selectiva de las nuevas muteínas con afinidad incrementada por la subunidad beta del receptor para la activación *in vivo* de las células efectoras del sistema inmune que portan el receptor dimérico beta/gamma, con respecto a la IL-2 y a la superkina H9 descrita en el arte previo.

Ejemplo 7. Demostración del efecto anti-tumoral de las nuevas muteínas

El efecto anti-tumoral de las proteínas de fusión basadas en las nuevas muteínas fusionadas a Fc humano LALA se estudió en el modelo de metástasis experimentales de melanoma MB16/F0. Se inocularon 100 000 células de esa línea tumoral por la vena de la cola de ratones C57BL/6 y a continuación se trató a cada grupo de animales con una inyección intraperitoneal de 5,6 µg de cada una de las proteínas de fusión que contienen a las muteínas de IL-2. El tratamiento con las proteínas de fusión se repitió cada 24 h hasta el quinto día. Se contaron las metástasis pulmonares a los 21 días después de la inoculación inicial. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una cola, seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

El conteo de metástasis pulmonares evidenció una reducción significativa en los animales tratados con las proteínas de fusión que contienen las nuevas muteínas con respecto a los animales del grupo control tratados con PBS y a los que recibieron las proteínas IL-2/FcLALA o H9/FcLALA (Figura 16).

Se demostró así el efecto anti-tumoral de las nuevas muteínas, en un escenario donde ni la IL-2 original ni la superkina H9 en un formato equivalente de proteínas de fusión tienen efecto anti-metastásico. Estos resultados corroboraron la mayor actividad biológica *in vivo* de las nuevas muteínas superagonistas en comparación no solo con la IL-2 original, sino con respecto a un superagonista descrito en el arte previo.

Ejemplo 8. Combinación de las mutaciones identificadas en la interfaz con la cadena beta del receptor con sustituciones conocidas por romper la interacción con la cadena alfa

Se diseñó y construyó una proteína de fusión al Fc humano (versión LALA) que

contiene una variante de IL-2 con la secuencia $_{80}\text{VPPEDLIE}_{87}+\text{I92L}$ en la interfaz con la cadena beta del receptor y las mutaciones R38A, F42A, Y45A y E62A, conocidas por romper la interacción con la cadena alfa en una variante llamada IL-2 no-alfa y adicionalmente la mutación K35E cuyos efectos sobre el aumento de la secreción de la IL2 se conocen (Rojas, G y otros, Sci. Reports. 9: 800, 2019). El conjunto anterior de mutaciones está descrito en la SEQ ID NO. 4 de la patente EP 3 543 252 B1. Se produjo esta proteína en el sistema de transfección transitoria de células HEK293-T adaptadas a crecer en suspensión ya descrito.

El efecto anti-tumoral de la proteína de fusión basada en la muteína combinada (SEQ ID NO. 124) se estudió en el modelo de metástasis experimentales de melanoma MB16/F0, en comparación con las proteínas de fusión que solo contenían los cambios en una de las interfaces. Se inocularon 100 000 células tumorales por la vena de la cola de ratones C57BL/6 y a continuación se trató a cada grupo de animales con una inyección intraperitoneal de 1,9 μg de cada una de las proteínas de fusión que contienen a las muteínas de IL-2. El tratamiento con las proteínas de fusión se repitió cada 24 h hasta el quinto día. Se contaron las metástasis pulmonares 21 días después de la inoculación inicial. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una cola, seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p<0.05$). La Figura 17 muestra la menor formación de metástasis en los animales tratados con la proteína de fusión basada en la muteína combinada, con respecto a los que recibieron PBS, la proteína de fusión control que contiene a la IL-2 original y las proteínas de fusión que contienen cambios solo en una de las dos interfaces (muteína no-alfa y variante $_{80}\text{VPPEDLIE}_{87}+\text{I92L}$). Estos resultados demuestran la utilidad de combinar las mutaciones en la interfaz con la cadena beta del receptor de la IL-2, descritas como parte de la presente invención, con otras sustituciones conocidas por sus efectos sobre las propiedades de la IL-2.