

**TÍTULO: MÉTODO PARA INCREMENTAR LOS NIVELES DE SECRECIÓN DE LA INTERLEUCINA-2 Y SUS PROTEÍNAS DERIVADAS.****CAMPO DE LA TÉCNICA**

- 5 La presente invención se relaciona con la rama de la Biotecnología, particularmente con un método para la introducción de mutaciones en el gen de la interleucina-2 (IL-2) que conducen a un aumento de los niveles de secreción de dicha molécula y de la familia de muteínas inmunomoduladoras derivadas de ella sin afectar sus funciones biológicas.

10

**ANTECEDENTES**

- La IL-2, originalmente descrita como un factor de crecimiento de las células T (Smith, K.A. Immunol. Rev. 51: 337-357, 1980), ha emergido posteriormente como un regulador con funciones duales dentro de 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 exhibe la habilidad de promover o modular negativamente las funciones efectoras del sistema inmune. Su rol esencial se considera actualmente relacionado con 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, que expresan de manera constitutiva altos niveles de la cadena alfa del receptor de la IL-2. Si bien las subunidades beta y gamma forman el receptor dimérico de afinidad intermedia presente constitutivamente en las células efectoras del sistema inmune, la presencia constitutiva de altos niveles de la cadena alfa dota a las células T reguladoras de un receptor trimérico de alta afinidad que permite la utilización preferencial de la citocina por esta población celular (Malek, T.R. y Castro, I. Immunity. 33: 153-165, 2010).

- La dicotomía funcional de la IL-2 se ha explotado para producir efectos terapéuticos contrapuestos sobre el sistema inmune y modular la respuesta inmune en el sentido deseado en distintos escenarios. Su capacidad inmunopotenciadora se ha utilizado para estimular respuestas anti-tumorales (Klapper, J.A. y otros, Cancer. 113: 293-301, 2008). Por otra parte, la capacidad de la IL-2 de estimular preferencialmente a las células T reguladoras se ha aprovechado mediante la aplicación de bajas dosis, insuficientes para estimular a las células T efectoras o producir efectos tóxicos, para el control de trastornos autoinmunes (Hartemann, A. y otros, Lancet Diabetes Endocrinol. 1: 295-305, 2013) e inflamatorios (Saadoun, D. y otros, N. Engl. J. Med.

365: 2067-2077, 2011), y de la enfermedad del injerto contra huésped (Koreth, A. y otros, N. Engl. J. Med. 365: 2055-2066, 2011).

La segregación de las interacciones de la IL-2 mediante la introducción de mutaciones en las diferentes interfaces de unión con las subunidades del receptor se ha propuesto  
5 como vía para la obtención de muteínas con distintas propiedades inmunomoduladoras. La perturbación selectiva de la interfaz con la cadena alfa por mutagénesis dirigida ha permitido obtener una molécula denominada no-alfa con capacidad reducida de estimular las células T reguladoras, pero que conserva su acción agonista sobre las células efectoras que portan el receptor dimérico  
10 beta/gamma (Carmenate, T. y otros, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013; US 9,206,243 B2). Esta molécula tiene un fuerte efecto antitumoral en ratones. Por otra parte, la disrupción por mutagénesis de la interfaz de la IL-2 con las subunidades beta y/o gamma puede generar antagonistas del receptor de la IL-2 que modulan selectivamente la estimulación de distintas poblaciones celulares (Shanafelt, A.B. y  
15 otros, Nat. Biotechnol. 18: 1197-1202, 2000; WO 2011/063770). Ejemplos de este tipo de moléculas son las muteínas M1 y M2 descritas en US 8,759,486 B2.

Además de las muteínas con pérdida de su capacidad de interacción, también se han descrito variantes mutadas de la IL-2 con propiedades superagonistas debido al incremento de su capacidad de unión a una u otra subunidad del receptor. El  
20 incremento de la afinidad por la subunidad beta conduce a la obtención de moléculas que estimulan potentemente a las células efectoras y tienen un fuerte efecto antitumoral (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012). Por otra parte, el incremento de la afinidad de la IL-2 por la subunidad alfa del receptor ha dado lugar a otras variantes superagonistas con capacidad superior de estimular la respuesta  
25 proliferativa de las células T *in vitro* (WO 2005/007121).

Las muteínas derivadas de la IL-2 anteriormente descritas se han obtenido a través del diseño racional, el tamizaje *in silico* y la evolución dirigida de la IL-2 presentada sobre la superficie de células de levadura. A pesar de que se ha logrado la presentación de la IL-2 biológicamente activa sobre fagos filamentosos (Buchli, P.J. y otros, Arch.  
30 Biochem. Biophys. 339: 79-84, 1997; Vispo, N.S. y otros, Immunotechnology 3: 185-193, 1997), esta plataforma tecnológica no se ha explotado aún para la selección de nuevas variantes de la citocina con propiedades modificadas.

Más allá de las propiedades inmunomoduladoras de la IL-2 y sus muteínas derivadas, un elemento esencial para su explotación terapéutica es el desarrollo de sistemas que  
35 permitan su obtención en cantidades suficientes. En particular, a escala de laboratorio, a escala industrial o por transfección o transducción de células o tejidos normales y/o tumorales.

La vía predominante para la producción por vía recombinante de la IL-2 y otras moléculas relacionadas ha sido la expresión en el citoplasma de *E. coli* formando cuerpos de inclusión, seguida por procedimientos de renaturalización *in vitro* (Devos, R. y otros, Nucl. Acids Res. 11: 4307-4323, 1983; Weir, M.P. y Sparks, J., Biochem. J. 245: 85-91, 1987). A pesar de la utilidad ya demostrada para esta estrategia, la exploración de otros sistemas de expresión que conduzcan desde un inicio a la obtención de moléculas correctamente plegadas muy similares a la IL-2 natural, ha continuado. La secreción de la IL-2 en algunos de estos sistemas de expresión se ha visto limitada por la tendencia de la IL-2 a agregarse (Halfmann, G. y otros, J. Gen. Microbiol. 139: 2465-2473, 1993; Cha, H.J. y otros, Biochem. Eng. J. 24: 225-233, 2005).

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención encontraron varias mutaciones no descritas anteriormente ni predecibles a partir del análisis de la estructura cristalina de la IL-2 humana, cuya introducción aumenta la capacidad de distintos tipos celulares para secretar la IL-2 humana recombinante y múltiples variantes mutadas con propiedades inmunomoduladoras específicas derivadas de ella. Dicho hallazgo sienta las bases para la utilización de estas mutaciones a escala productiva.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

En una realización la presente invención se basa en un método que conduce al incremento de los niveles de secreción de la IL-2 humana recombinante en distintos hospederos sin afectar sus funciones biológicas. Dicho método se basa en la introducción de mutaciones únicas en los genes codificantes de la IL-2 humana y otros polipéptidos derivados de ella, entre las cuales se incluyen pero no se limitan a muteínas derivadas de la IL-2 humana diseñadas para actuar como antagonistas, superagonistas o agonistas selectivos. El incremento en los niveles de secreción de dichas proteínas cuando se emplea el método de la presente invención, es al menos tres veces con relación a las contrapartidas sin mutar. Como muteínas derivadas se entiende en la presente invención a aquellas que tienen más del 90% de identidad con la IL-2 humana.

El método de la presente invención se relaciona con mutaciones que conducen a un cambio no conservativo del aminoácido que ocupa la posición 35 de la secuencia proteica primaria (Lys en la secuencia original), preferiblemente las sustituciones K35E, K35D y K35Q.

Particularmente la presente invención se relaciona con las proteínas obtenidas según el método aquí descrito seleccionadas del grupo que comprenden de la SEQ ID NO. 1 a la 18.

Son también objeto de la presente invención las construcciones genéticas que incluyen los genes mutados anteriormente descritos fusionados a otras secuencias nucleotídicas y que codifican para la síntesis de proteínas de fusión formadas por la IL-2 u otros polipéptidos inmunomoduladores derivados de ella y secuencias proteicas adicionales. Dentro de las secuencias proteicas adicionales se incluyen pero no se limitan las proteínas de la cápside de los fagos filamentosos, albúmina, la región Fc de los anticuerpos, anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo que incluyan sus dominios variables.

En una realización particular, los hospederos que se emplean para la obtención de las moléculas antes descritas incluyen pero no se limitan a *E. coli*, levaduras y células de mamíferos como HEK-293, CHO, NSO, entre otras. El método de la presente invención es útil para mejorar la eficiencia de la producción de la IL-2 y otros polipéptidos derivados de ella, tanto a escala de laboratorio como industrial. Las proteínas obtenidas mediante el método de la presente invención se pueden emplear con fines terapéuticos.

En otra realización es objetivo de la presente invención la modificación de la fisiología de células y/o tejidos normales o tumorales a través de la expresión de la IL-2 humana y/o de la familia de muteínas inmunomoduladoras derivadas de ella (solas o fusionadas a otras proteínas), tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplo la transducción de linfocitos T, linfocitos B o células NK para terapias de transferencia adoptiva; o la transducción/transfección directa de un tejido tumoral. El método de la presente invención es útil para incrementar la secreción de las moléculas de interés en estos contextos.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.**

La presente invención se basa en un método que conduce al incremento de los niveles de secreción de la IL-2 humana recombinante en distintos hospederos sin afectar sus funciones biológicas. Dicho método se basa en la introducción de mutaciones únicas en los genes codificantes de la IL-2 humana y otros polipéptidos derivados de ella, entre las cuales se incluyen pero no se limitan a muteínas derivadas de la IL-2 humana diseñadas para actuar como antagonistas, superagonistas o agonistas selectivos.

35

**Identificación de mutaciones que aumentan la capacidad de proteínas derivadas de la IL-2 humana de ser presentadas sobre fagos filamentosos.**

- La selección de polipéptidos derivados de la IL-2 humana, con mutaciones únicas que conducen al incremento de sus niveles de presentación sobre fagos filamentosos puede realizarse a partir de bibliotecas de más de  $10^8$  moléculas presentadas sobre fagos filamentosos. Los genes correspondientes a dichas variantes pueden insertarse 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 utilizarse para la producción de partículas virales que exponen en su superficie las variantes proteicas.
- Las bibliotecas de partida pueden incluir distintos grados de diversificación a lo largo de toda la secuencia o en un conjunto 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 subconjunto de residuos escogidos. La diversificación puede lograrse a través de la mutagénesis al azar o sitio-dirigida.
- La selección de los fagos con niveles incrementados de presentación de la IL-2 humana puede basarse en la incubación de las mezclas de fagos provenientes de las bibliotecas en contacto con una molécula selectora inmovilizada sobre una superficie sólida, la eliminación de los fagos no unidos mediante lavados, y la elución de los fagos unidos en condiciones que interfieran con las interacciones proteicas. Como molécula selectora puede utilizarse una de las subunidades del receptor de la IL-2 obtenida por vía recombinante o un anticuerpo monoclonal dirigido contra la IL-2 o contra un péptido fusionado genéticamente a la misma. Pueden realizarse varios ciclos sucesivos de selección en condiciones similares. El análisis de las secuencias de ADN insertadas en los fagomidios seleccionados puede revelar regularidades que conduzcan a la identificación de aquellas sustituciones más abundantes y potencialmente relacionadas con el aumento de la capacidad de presentación sobre los fagos.
- Los niveles de presentación de las variantes mutadas de la IL-2 pueden evaluarse a través de ensayos de unión como el ELISA, sobre una molécula de captura inmovilizada que reconozca de forma equivalente a las distintas variantes mutadas y a la IL-2 nativa de referencia. Como molécula de captura para este tipo de evaluaciones se prefiere un anticuerpo contra una secuencia peptídica marcadora fusionada genéticamente a las variantes de IL-2, tal como el péptido *c-myc*, que se encuentra fusionado a todas las proteínas foráneas en el sistema de expresión basado en el vector fagomidio pCSM.
- La generalidad de los efectos de las mutaciones identificadas en el tamizaje anteriormente descrito sobre la familia de muteínas derivadas de la IL-2 puede

demostrarse a través de la introducción de dichos cambios en la secuencia de las distintas variantes mutadas descritas para la IL-2 humana que incluyen un número variable de sustituciones de naturaleza diversa a lo largo de su secuencia, dirigidas a afectar selectivamente las interacciones con las distintas subunidades del receptor de la IL-2, con la consiguiente modificación de sus funciones inmunomoduladoras. Todas estas muteínas modificadas se presentan sobre fagos filamentosos, a partir de la inserción de sus genes codificantes en vectores de tipo fagomidio. La evaluación de los niveles de presentación de cada muteína sobre los fagos filamentosos puede realizarse por ELISA como se describió para la IL-2. Como referencia para calcular la magnitud del aumento de la presentación sobre los fagos asociado a la introducción de los cambios identificados como parte de la presente invención, se utilizan las muteínas originales sin ningún cambio adicional y presentadas sobre fagos.

Alternativamente, el método de la presente invención se puede realizar mediante la explotación de otras plataformas de la biología combinatoria, como la presentación en levaduras o células de mamífero, con el fin de seleccionar variantes de la IL-2 y/o sus muteínas derivadas con niveles incrementados de presentación sobre la membrana celular.

Del proceso de selección anteriormente descrito pueden emerger mutaciones recurrentes de tipo no conservativo en la posición 35 (particularmente K35E, K35D y K35Q).

**Utilización de las mutaciones identificadas para incrementar los niveles de secreción de la IL-2 humana y sus muteínas derivadas como proteínas solubles y su re-naturalización a partir de cuerpos de inclusión.**

Una vez identificado un grupo de mutaciones que conducen a un aumento de la presentación de la IL-2 humana y sus muteínas derivadas sobre los fagos filamentosos, puede demostrarse el efecto de esos mismos cambios sobre la secreción de las proteínas solubles, a partir de su introducción en los genes codificantes correspondientes clonados en vectores de expresión soluble para levaduras o células de mamíferos. La evaluación de las concentraciones de las proteínas secretadas al sobrenadante por las células hospederas que contienen dichos vectores de expresión permite evidenciar el aumento de la secreción de la IL-2 y sus muteínas derivadas asociado a la introducción de las mutaciones que emplea el método de la presente invención, en comparación con sus contrapartidas originales que no incluyen dichos cambios.

Alternativamente el incremento de la producción de la IL-2 humana y sus muteínas derivadas puede verificarse a partir de la transfección y/o transducción de células y/o tejido normales y/o tumorales *in vivo* o *in vitro*.

Los estudios descritos anteriormente empleando el método de la presente invención puede realizarse con la IL-2 y sus muteínas derivadas solas o fusionadas a secuencias polipeptídicas adicionales, tales como la albúmina, región Fc de las inmunoglobulinas humanas, anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo basados en sus regiones variables.

Las mutaciones descritas en la presente invención pueden también utilizarse para mejorar los procesos de re-naturalización *in vitro* de la IL-2 humana y sus muteínas derivadas, obtenidas como cuerpos de inclusión en el citoplasma de *E. coli*. El aumento de la eficiencia de la re-naturalización puede evaluarse midiendo la actividad biológica específica por masa de proteína comparándola con la variante sin mutar.

**15 Demostración de la compatibilidad de las mutaciones utilizadas con las funciones biológicas de la IL-2 y la modulación selectiva de sus interacciones con las subunidades del receptor.**

La evaluación de la actividad biológica de las variantes de la IL-2 modificadas según el método de la presente invención puede abarcar técnicas *in vitro* e *in vivo*, dirigidas a evidenciar la conservación de su capacidad de inducir la proliferación, diferenciación y activación de distintos tipos celulares, tales como subpoblaciones de linfocitos T, células NK y líneas celulares de origen linfoide dependientes de la IL-2 para su crecimiento. El efecto de la IL-2 nativa sobre la proliferación de linfocitos T que expresan el receptor trimérico, se puede determinar por el ensayo de proliferación *in vitro* de la línea celular CTLL-2 empleando la técnica colorimétrica de reducción del Alamar blue o por citometría de flujo. El efecto de la IL-2 nativa sobre la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a linfocitos T reguladores *in vitro* y la capacidad de esta molécula de expandir y activar las células NK *in vitro*, se determinan por citometría de flujo.

La compatibilidad de las mutaciones utilizadas en el método de la presente invención con la modulación selectiva de las interacciones de la IL-2 con su receptor puede evidenciarse a partir de la introducción de dichos cambios sobre la armazón de las muteínas previamente diseñadas y/o seleccionadas para aumentar o disminuir su capacidad de unión a alguna de las subunidades del receptor de la IL-2. La ocurrencia de los cambios deseados en las propiedades de unión puede demostrarse a través de la determinación directa de las mismas en experimentos tipo ELISA sobre placas de microtitulación recubiertas con cada una de las subunidades del receptor. Como

herramientas de verificación adicional pueden emplearse los ensayos previamente descritos para caracterizar la actividad inmunomoduladora y/o antitumoral de las distintas muteínas *in vitro* e *in vivo*. Para la muteína no-alfa (Carmenate, T. y otros, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013), se puede comprobar que mantiene igual capacidad

5 que la IL-2 nativa para estimular la proliferación de los linfocitos T CD8+ *in vitro*. En el caso de una muteína con capacidad de unión incrementada a la subunidad beta del receptor y que tiene actividad superagonista (muteína super-beta), se puede comprobar que mantiene mayor capacidad que la IL-2 nativa para estimular la proliferación de las células NK *in vitro*. En ambos casos la proliferación puede

10 determinarse por citometría de flujo. El efecto diferencial sobre la proliferación de las poblaciones *in vivo*, se puede determinar por experimentos de incorporación de bromodeoxiuridina. Se puede demostrar que ambas muteínas inducen mayor efecto antitumoral *in vivo* que la IL-2 nativa, en el modelo de metástasis experimental que emplea la línea de melanoma MB16F0.

15

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Evaluación por ELISA de los niveles de presentación de la IL-2 mutada sobre fagos filamentosos. Las distintas preparaciones de fagos purificados se ajustaron a una concentración equivalente de  $10^{13}$  partículas virales/ml.

20 **Figura 2.** Determinación por ELISA de los niveles de secreción de las proteínas de fusión formadas por la IL-2 y sus muteínas derivadas y la región Fc de la IgG1 humana por células HEK293-T en suspensión. Las células se transfectaron con polietilenimina y las construcciones genéticas que codifican para las proteínas de fusión formadas por:

- 25 a. IL-2 e IL-2 con la mutación K35E  
b. IL-2 no-alfa (NA) e IL-2 no-alfa con la mutación adicional K35E  
c. IL-2 super-beta (SB) e IL-2 super-beta con la mutación adicional K35E  
d. IL-2 no-gamma M1 (NG M1) e IL-2 no-gamma M1 con la mutación adicional K35E.
- 30 e. IL-2 no-gamma M2 (NG M2) e IL-2 no-gamma M2 con la mutación adicional K35E

**Figura 3.** Evaluación por ELISA de la conservación de las interacciones moleculares de la IL-2 nativa en la variante K35E.

**Figura 4.** Conservación de la actividad biológica de la IL-2 con el cambio K35E utilizando la técnica de proliferación de la línea celular CTLL-2.

**Figura 5.** Capacidad de la IL-2 K35E de expandir poblaciones celulares dependientes de IL-2 *in vivo*.

5 5a. Fotografía de bazo de ratones inyectados con la variante K35E/Fc 2.2.2 de la IL-2 y PBS.

5b. Histogramas obtenidos a partir del análisis por citometría de flujo de la población de células CD3+CD8+ con fenotipo de memoria (Cd44 *hi*) en los bazo.

**Figura 6.** Demostración por ELISA de la compatibilidad de la sustitución K35E con la pérdida de la capacidad de unión a la subunidad alfa del receptor descrita para una muteína derivada de la IL-2. Las placas de microtitulación se recubrieron con la cadena alfa recombinante de origen humano (a) y de ratón (b).

10

**Figura 7.** Demostración por ELISA de la compatibilidad de la sustitución K35E con el incremento de la capacidad de unión a la subunidad beta del receptor descrita para una muteína derivada de la IL-2.

15

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1. Selección y caracterización de fagos filamentosos que presentan la IL-2 humana mutada funcional.**

20

Se construyó una biblioteca de aleatorización suave de un grupo de posiciones de la IL-2 humana. Se escogieron aquellas posiciones ocupadas por residuos cuyas cadenas laterales se encuentran en la interfaz con la subunidad alfa del receptor (K35, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, Q74 y Y107).

25 Para la aleatorización de estas posiciones se diversificó el gen de la IL-2 humana por mutagénesis de Kunkel con oligonucleótidos mutagénicos sesgados que conservaban el 85% del nucleótido original en cada posición de los tripletes a modificar, con un 15% de la mezcla equimolar de los otros tres nucleótidos para introducir un grado moderado de diversidad en toda la zona. De esta forma, si bien la biblioteca

30 compuesta por 10<sup>9</sup> clones exploró en su conjunto la presencia de los 20 aminoácidos en cada posición de la interfaz, cada molécula dentro de la biblioteca contuvo unas

pocas sustituciones con respecto a la IL-2 original, restringiendo la búsqueda de nuevos polipéptidos al espacio de secuencias funcionales más cercano a la molécula de partida.

Los fagos producidos a partir de la biblioteca se purificaron por precipitación con polietilenglicol según procedimientos previamente establecidos (Marks, J. y otros, J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991). Para aislar variantes mutadas funcionales de la IL-2 humana en virtud de su capacidad de ser presentadas sobre los fagos, se incubaron dichas partículas virales sobre inmunotubos (Nunc, Dinamarca), recubiertos con la subunidad alfa recombinante del receptor de la IL-2 (R&D). Se realizaron dos procedimientos de selección independientes sobre las subunidades alfa recombinantes humana y de ratón. Después de lavar para eliminar los fagos no unidos, los fagos unidos se eluyeron por incubación con una solución básica de trietilamina. Se infectaron bacterias de la cepa TG1 con los fagos seleccionados, que se amplificaron con el fago auxiliador M13KO7 y se utilizaron como material de partida para una nueva ronda de selección. Se realizaron cuatro ciclos de selección de fagos. La secuenciación de los genes insertados en los fagomidios seleccionados (provenientes de los ciclos tercero y cuarto de selección), reveló regularidades entre las variantes mutadas obtenidas. Predominó el aislamiento de la IL-2 original (altamente representada en la biblioteca de partida), pero se observó una proporción minoritaria de variantes con las mutaciones K35E, K35D y K35Q, que demostraron la influencia positiva de los cambios no conservativos en la posición 35 sobre la presentación de la IL-2 funcional sobre los fagos filamentosos. La mutación K35E fue la más frecuente. Este hallazgo resultó sorprendente, pues el análisis de la estructura cristalina del complejo IL-2/receptor (códigos PDB 3B5I y 2ERJ) indica que el residuo original K35 está involucrado en interacciones iónicas en la periferia polar de la interfaz con la subunidad alfa del receptor, y la capacidad de los cambios no conservativos (inversión de carga en dos de los casos) de mantener la interacción con la molécula selectora resultó por tanto inesperada.

**Ejemplo 2. Demostración del aumento de la secreción y presentación sobre fagos filamentosos de la IL-2 humana con cambios no conservativos en la posición 35.**

Se comparó la capacidad de las distintas variantes mutadas de IL-2 humana seleccionadas a partir de la biblioteca de ser secretadas al periplasma de *E. coli* y presentadas sobre la superficie de los fagos filamentosos. Se utilizó como molécula de

referencia la IL-2 nativa. Se construyó además por mutagénesis de Kunkel la variante K35R (cambio conservativo en la posición 35), como un control adicional. Todas estas proteínas se obtuvieron mediante la inserción de sus genes codificantes en el vector fagomidio pCSM (fusionados al gen 3 del fago M13) y la producción posterior de fagos a partir de bacterias de la cepa TG1 de *E. coli* transformadas con dichas construcciones genéticas (Rojas, G. y otros, Immunobiology. 218: 105-113, 2013). Los niveles de presentación sobre los fagos de cada una de las variantes se evaluaron mediante un ELISA en placas de microtitulación recubiertas con el anticuerpo monoclonal 9E10. Se detectaron los fagos unidos con un anticuerpo anti-M13 conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante. Se demostró que los cambios K35E, K35D y K35Q provocan un aumento de la presentación de la IL-2 humana sobre los fagos con respecto a la molécula original (Figura 1). La magnitud de este aumento fue de 10 veces en los casos de K35E y K35D (inversión de carga en ambos) y para la mutación K35Q fue 7 veces. Por el contrario, el cambio conservativo K35R no modificó la capacidad de la IL-2 humana de ser presentada sobre los fagos (Figura 1). Se seleccionó el cambio K35E para los estudios posteriores.

**Ejemplo 3. El efecto de la mutación K35E sobre la secreción y presentación en fagos se extiende a un panel de variantes mutadas de la IL-2.**

Se introdujo la mutación K35E por mutagénesis de Kunkel en los genes codificantes de varias variantes mutadas de la IL-2 humana (en el formato de presentación sobre fagos filamentosos). El panel de moléculas derivadas de la IL-2 incluyó cuatro muteínas previamente descritas con distintas funciones inmunomoduladoras: una muteína no-alfa, con actividad agonista selectiva sobre las células T efectoras (Carmenate, T. y otros, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013; US 9,206,243 B2), una muteína que pierde la capacidad de interacción con la subunidad gamma del receptor (no-gamma), con funciones antagonistas (US 8,759,486 B2), una muteína con capacidad de unión incrementada a la subunidad beta del receptor (super-beta) con actividad superagonista y una muteína con capacidad de unión incrementada a la subunidad alfa del receptor (super-alfa), con actividad superagonista (Levin, A.M. y otros, Nature. 484: 529-533, 2012; WO 2005/007121). Se produjeron y purificaron fagos que presentaban cada una de estas variantes (además de las moléculas originales sin cambios en la posición 35) y se evaluaron los niveles de presentación de la proteína foránea mediante un ELISA en placas de microtitulación recubiertas con el anticuerpo monoclonal 9E10. Se utilizó como referencia una preparación de fagos

purificados que presentaban la IL-2 nativa (asumiendo una concentración de 100 unidades arbitrarias/ml). A partir de esta preparación se construyó una curva patrón y se calcularon los niveles relativos de presentación para cada una de las variantes. La Tabla 1 muestra un aumento en los niveles de presentación sobre fagos de cada muteína provocado por la introducción del cambio K35E.

**Tabla 1.** Aumento en los niveles de presentación sobre fagos de las muteínas ensayadas provocado por la introducción del cambio K35E.

| Muteína       | Aumento en los niveles relativos de presentación sobre fagos provocado por la introducción de K35E |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| No-alfa       | 6x                                                                                                 |
| No-gamma M1   | 29x                                                                                                |
| Super-beta H9 | 18x                                                                                                |
| Super-alfa    | 14x                                                                                                |

**Ejemplo 4. La sustitución K35E aumenta la secreción de proteínas de fusión basadas en la IL-2 y sus muteínas derivadas a partir de células hospederas humanas.**

Se diseñaron construcciones genéticas basadas en los genes de la IL-2 humana y de sus muteínas derivadas (fusionados al gen de la región Fc de la IgG1 humana) clonados en el vector de expresión pCMX. Se construyó un panel adicional de moléculas equivalentes a las que se les introdujo la sustitución K35E. Se transfectaron células humanas HEK293 T (adaptadas a crecer en suspensión) con cada una de las construcciones genéticas anteriores mezcladas con polietilenimina. El volumen final de cada transfección fue de 50 ml. Se colectaron los sobrenadantes de las células transfectadas después de 6 días de cultivo. Se evaluó la presencia de la IL-2 recombinante y de sus muteínas derivadas en los sobrenadantes mediante un ELISA sobre placas de microtitulación recubiertas con el anticuerpo monoclonal IL-2.2 (que reconoce un epítipo lineal presente en el panel de muteínas analizadas). Las proteínas de fusión capturadas se detectaron con un anticuerpo anti-Fc humano marcado con peroxidasa de rábano picante. Los niveles de las proteínas de fusión en los sobrenadantes fueron mayores para las moléculas que contienen la mutación

K35E en comparación con sus contrapartidas (Figura 2a-e). Se purificaron dichas proteínas recombinantes por afinidad a una matriz de proteína A. La Tabla 2 muestra las cantidades obtenidas después de cada proceso de purificación.

- 5 **Tabla 2.** Rendimiento de la purificación de la IL-2 y sus muteínas derivadas fusionadas a la región Fc de las inmunoglobulinas humanas a partir de células HEK-293T transfectadas en suspensión.

| Molécula       | Variante original | Variante K35E | Aumento asociado al cambio K35E |
|----------------|-------------------|---------------|---------------------------------|
| IL-2/Fc        | 0,28 mg           | 4,24 mg       | 15x                             |
| No-alfa/Fc     | 0,16 mg           | 1,44 mg       | 9x                              |
| Super-alfa/Fc  | 1,72 mg           | 5,08 mg       | 3x                              |
| Super-beta/Fc  | 0,04 mg           | 1,08 mg       | 27x                             |
| No-gamma M1/Fc | 0,04 mg           | 0,24 mg       | 6x                              |
| No-gamma M2/Fc | 0,04 mg           | 0,2 mg        | 5x                              |

**Ejemplo 5. La mutación K35E es compatible con las interacciones moleculares de la IL-2 nativa.**

10

Se evaluó mediante ELISA la capacidad de la IL-2 mutada recombinante (K35E) (en su formato de homodímero fusionado a un fragmento Fc de inmunoglobulinas humanas) de interactuar con un panel de moléculas que son capaces de unirse a la IL-2 nativa. Las placas de microtitulación se recubrieron con cada uno de los cuatro anticuerpos monoclonales que reconocen distintas regiones de la IL-2 humana o con la subunidad alfa del receptor de la IL-2 de origen humano o la de ratón. La IL-2 mutada capturada se detectó con un anticuerpo anti-Fc humano marcado con peroxidasa de rábano picante. Como control se utilizó un homodímero similar recombinante producido por células HEK293-T en suspensión que no presenta el cambio K35E. La unión del homodímero mutado a los anticuerpos y a las subunidades alfa no se vio afectada por la presencia de la mutación. Por el contrario, la reactividad de la variante mutada frente a todas las otras moléculas fue superior que la de su contrapartida recombinante no mutada (Figura 3), lo que indica que la antigenicidad y

15

20

funcionalidad de la variante K35E reproducen las de la IL-2 nativa en mayor medida que las de la proteína recombinante no mutada obtenida en condiciones similares.

5 **Ejemplo 6. La variante K35E de la IL-2 fusionada a la región Fc de las inmunoglobulinas humanas conserva la capacidad de estimular la proliferación de células CTLL-2.**

Se evaluó la capacidad de la IL-2 humana con el cambio K35E (obtenida como proteína de fusión a la región Fc de la IgG1 humanas en células HEK293-T transfectadas en suspensión) de inducir la proliferación de la línea celular CTLL-2.

10 Como control se utilizó IL-2 humana recombinante. Las células se cultivaron en presencia de un rango de concentraciones de cada una de las dos proteínas purificadas y se determinó la proliferación en un ensayo colorimétrico de reducción del colorante Alamar blue (Figura 4). El cálculo de la actividad específica de cada proteína se realizó con el programa GraphPad a partir de la dosis de molécula que produjo el

15 50% del máximo nivel de proliferación. La actividad específica de la IL-2 fusionada a Fc que incluye el cambio K35E fue de  $4 \times 10^6$  UI/mg, en el mismo rango que la de la IL-2 recombinante usada como referencia ( $2,3 \times 10^6$  UI/mg). Este resultado evidenció la conservación de la actividad biológica de la IL-2 en presencia de la mutación K35E.

20 **Ejemplo 7. La variante K35E de la IL-2 fusionada a la región Fc de las inmunoglobulinas humanas tiene la capacidad de estimular la expansión de células T CD8 de memoria *in vivo*.**

Para evaluar la capacidad de la IL-2 mutada recombinante (K35E) fusionada a Fc de estimular la expansión de poblaciones celulares dependientes de IL-2 *in vivo* se

25 inyectaron ratones C57BL/6 con cinco dosis diarias de  $4 \times 10^4$  UI de esta molécula. Los animales se sacrificaron al término del tratamiento y se evaluó el tamaño de sus bazo. Se determinó por citometría de flujo el tamaño de la población de células CD3+CD8+ con fenotipo de memoria (Cd44 *hi*) en los bazo. Como controles se utilizaron ratones inyectados con tampón fosfato salino (PBS). La IL-2 mutada (K35E)

30 fusionada a Fc tuvo el efecto esperado de estimular la expansión de células T CD8 de memoria al provocar el crecimiento de los bazo (Figura 5a) y el aumento (duplicación) de la proporción de células T con fenotipo de memoria en ellos (Figura 5b).

**Ejemplo 8. La sustitución K35E es compatible con la pérdida de la capacidad de unión a la subunidad alfa del receptor de la IL-2 que determina las propiedades de un agonista selectivo.**

- 5 Se evaluó por ELISA la capacidad de unión de la IL-2 humana y de una muteína no-  
alfa previamente descrita por Carmenate, T. y otros, J. Immunol. 190: 6230-6238,  
2013; US 9,206,243, caracterizada por tener las mutaciones R38A, F42A, Y45A y  
E62A y por una pérdida de la capacidad de unión a la subunidad alfa del receptor de la  
10 IL-2 dirigida a disminuir la estimulación de las células T reguladoras, sin afectar la  
acción agonista sobre las células efectoras que portan el receptor dimérico  
beta/gamma. Tanto la IL-2 humana como la muteína no-alfa tenían la modificación  
adicional K35E y se fusionaron a la región Fc de la IgG1 humana. Las placas de  
microtitulación se recubrieron con la cadena alfa recombinante de origen humano (a) y  
de ratón (b). Las proteínas de fusión capturadas se detectaron con un anticuerpo anti-  
15 Fc humano marcado con peroxidasa de rábano picante. La introducción del cambio  
K35E en ella condujo a una nueva molécula con niveles de expresión superiores a los  
de la muteína original (Figura 2b), y además mostró una severa reducción en su  
capacidad de unión a la cadena alfa del receptor tanto humana como de ratón con  
respecto a la IL-2 nativa que también incluye el cambio K35E (Figura 6). Estos  
20 resultados aportaron las primeras evidencias de la compatibilidad de la mutación K35E  
con la manipulación selectiva de las interacciones y funciones inmunomoduladoras de  
las muteínas derivadas de la IL-2.

**Ejemplo 9. La sustitución K35E es compatible con el aumento de la interacción  
25 con la subunidad beta del receptor de la IL-2 descrito para una variante  
superagonista.**

- Se evaluó por ELISA la capacidad de unión de la IL-2 y la muteína super-beta  
caracterizada por las mutaciones L80F, R81D, L85V, I86V e I92F (ambas con la  
modificación adicional K35E y fusionadas a la región Fc de la IgG1 humana), sobre  
30 placas de microtitulación recubiertas con la cadena beta humana recombinante. Las  
proteínas de fusión capturadas se detectaron con un anticuerpo anti-Fc humano  
marcado con peroxidasa de rábano picante. La introducción del cambio K35E, dio  
lugar a una nueva molécula con niveles de expresión superiores a los de la muteína  
original (Figura 2c) y con capacidad incrementada de unirse a la subunidad beta del  
35 receptor de la IL-2 que constituye la base de la acción superagonista de la molécula

original (Figura 7). Este resultado amplió las evidencias de compatibilidad de la mutación K35E con el diseño de nuevas moléculas derivadas de la IL-2 que tengan cambios en sus interacciones con las distintas subunidades del receptor y en sus funciones inmunomoduladoras.

5

10

## MÉTODO PARA INCREMENTAR LOS NIVELES DE SECRECIÓN DE LA INTERLEUCINA-2 Y SUS PROTEÍNAS DERIVADAS.

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para incrementar los niveles de secreción de la IL-2 humana recombinante y sus muteínas derivadas sin afectar sus funciones biológicas caracterizado porque se basa en la introducción de una única mutación en su secuencia.
2. El método según la reivindicación 1 caracterizado porque el incremento en los  
10 niveles de secreción es al menos tres veces en relación a la IL-2 humana recombinante y sus muteínas derivadas originales.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizado porque las muteínas derivadas son aquellas que tienen más del 90% de identidad con la IL-2 humana.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizado porque la mutación que se introduce es de tipo no conservativa.
5. El método según la reivindicación 4 caracterizado porque la mutación no conservativa se introduce en la posición 35 de la secuencia primaria.
6. El método según la reivindicación 5 caracterizado porque la mutación en la  
20 posición 35 se selecciona del grupo que comprende:
  - K35E,
  - K35D y
  - K35Q.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6 caracterizado porque la  
25 IL-2 humana recombinante y sus muteínas derivadas están fusionadas a alguna de las proteínas seleccionadas del grupo que comprende:
  - Proteínas de la cápside de los fagos filamentosos,
  - albúmina
  - la región Fc de los anticuerpos,
  - 30 - anticuerpos completos y
  - fragmentos de anticuerpo que incluyan sus dominios variables.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7 caracterizado porque el  
hospedero se selecciona del grupo que comprenden:
  - *E. coli*,
  - 35 - células de mamíferos y
  - levaduras.

9. Las proteínas obtenidas según el método de la reivindicación 8.
10. Las proteínas obtenidas según el método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8 seleccionadas del grupo que comprenden:
- SEQ ID NO. 1
  - 5        - SEQ ID NO. 2
  - SEQ ID NO. 3
  - SEQ ID NO. 4
  - SEQ ID NO. 5
  - SEQ ID NO. 6
  - 10       - SEQ ID NO. 7
  - SEQ ID NO. 8
  - SEQ ID NO. 9
  - SEQ ID NO. 10
  - SEQ ID NO. 11
  - 15       - SEQ ID NO. 12
  - SEQ ID NO. 13
  - SEQ ID NO. 14
  - SEQ ID NO. 15
  - SEQ ID NO. 16
  - 20       - SEQ ID NO. 17 y
  - SEQ ID NO. 18.
11. Uso del método según la reivindicación 8 a escala de laboratorio o industrial.
12. Uso de las proteínas obtenidas según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 con fines terapéuticos.
- 25    13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 en la expansión *in vitro* de células T para terapias de transferencia adoptiva.
14. El método según las reivindicaciones 5-7 caracterizado porque se emplea para la modificación de la fisiología de células y/o tejidos normales o tumorales.
15. El método según la reivindicación 14 donde las células modificadas son
- 30       linfocitos T, linfocitos B o células NK.

35