

CONJUGADOS DE CITOQUINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

AUTOINMUNES

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 62/540,781, presentada el 3 de agosto de 2017, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Listado De Secuencias

- 10 [0002] La solicitud instantánea contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 3 de agosto de 2018, se llama 46085-710_602_SL.txt y tiene un tamaño de 3,703 bytes.

15 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

- [0003] Las poblaciones distintas de células T modulan el sistema inmunitario para mantener la homeostasis y la tolerancia, inmunitarias. Por ejemplo, las células T reguladoras (Treg) previenen respuestas inapropiadas del
- 20 sistema inmunitario al prevenir la autorreactividad patológica mientras que las células T citotóxicas atacan y destruyen las células infectadas o cancerosas. En algunos casos, la modulación de las diferentes poblaciones de células T proporciona una opción para el tratamiento de una

enfermedad o indicación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0004] En el presente documento, en ciertas realizaciones, se encuentran conjugados de citocinas y se usan en el

5 tratamiento de una o más indicaciones. En algunas realizaciones, también se describen en el presente documento los conjugados de interleucina 2 (IL-2) y el uso en el tratamiento de una o más indicaciones. En algunos casos, la una o más indicaciones comprenden una enfermedad autoinmune.

10 En algunos casos, aquí se describen conjugados de IL-2 para modular la interacción entre los receptores de IL-2 e IL-2 para estimular o expandir poblaciones de células T reguladoras (células Treg) específicamente reguladoras. En algunos casos, aquí se describen conjugados de IL-2 con

15 semivida in vivo extendida, toxicidad reducida o ventanas terapéuticas expandidas. En casos adicionales, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas y kits que comprenden uno o más conjugados de interleucina (por ejemplo, conjugados de IL-2) descritos en el presente

20 documento.

[0005] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un polipéptido de interleucina 2 (IL-2) aislado y modificado que comprende al menos un aminoácido no natural en una posición que reduce la potencia de señalización del

3

receptor al receptor de interleucina 2 $\beta\gamma$ (IL-2R $\beta\gamma$) o reduce un reclutamiento de una subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β , pero conserva una activación significativa del receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en donde, la potencia de

5 señalización del receptor reducida se compara con la potencia de señalización del receptor entre un salvaje de polipéptido de tipo IL-2 e IL-2R $\beta\gamma$, y en donde el reclutamiento se compara con un reclutamiento de una subunidad IL-2R α por un polipéptido de tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones,

10 la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84,

15 S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas

20 realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de

aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos uno no natural todos los aminoácidos se seleccionan entre P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y T113, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponden a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9 y H16, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de Q22, N26, N88 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de E15, D20, D84 y E95, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona

de L12, L19 y M23, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de Q22 y N26, en donde la numeración de

5 los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un antinatural aminoácido: es un análogo de lisina; es un análogo de cisteína o un análogo de histidina; comprende una cadena lateral aromática; comprende un grupo azido; comprende un grupo alquino; o

10 comprende un grupo aldehído o cetona. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural no comprende una cadena lateral aromática. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende

15 N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, lisina norborneno, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonil lisina, ácido oxononanóico 2-amino-8, ácido oxooctanóico 2-amino-8, p-acetil-L-fenilalanina, p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), p-yodo-L-fenilalanina, m-acetilfenilalanina, ácido oxononanóico

20 2-amino-8, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acilo-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-

fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-allyl-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfonotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonoserina, L-3-(2-naftil) alanina, ácido propanóico 2-amino-3-((2-((3-
5 (benciloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil), 2-amino-3-(fenilo selanil)propanóico o selenocisteína. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora al polipéptido IL-2 modificado por un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. En algunas realizaciones, el ARNt
10 ortogonal del par de sintetasa/ARNt ortogonal comprende al menos una nucleobase no natural. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado se une covalentemente a un residuo conjugado a través del al menos un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el residuo conjugante
15 comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol
20 olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquil), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfenceno, polioxazolinás (POZ), poli(N-acriloilmorfolina), o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una molécula de PEG. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es un PEG lineal. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es un PEG ramificado. En algunas

5 realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o hidroxietilalmidón (HES). En algunas realizaciones, el lípido

10 comprende un ácido graso. En algunas realizaciones, el ácido graso comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20

15 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 átomos de carbono, de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 22

20 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el ácido graso es un ácido graso saturado. En algunas realizaciones, la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una

transtiretina. En algunas realizaciones, la proteína comprende un anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo comprenden una porción Fc de un anticuerpo.

5 En algunas realizaciones, el péptido comprende un péptido XTEN, un polímero de homoaminoácido rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunas realizaciones, el residuo

10 conjugado se une indirectamente al menos un aminoácido no natural de la IL-2 modificada a través de un conector. En algunas realizaciones, el conector comprende un conector homobifuncional, un conector heterobifuncional, un conector de longitud cero, un conector dipéptido escindible o no

15 escindible, un grupo maleimida, un espaciador o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado tiene una disminución en la potencia de señalización del receptor a IL-2R $\beta\gamma$, y la disminución en la potencia de señalización del receptor es

20 aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces o más a IL-2R $\beta\gamma$ en relación con un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido

IL-2 modificado es: un fragmento funcionalmente activo de un polipéptido IL-2 de longitud completa; un polipéptido IL-2 recombinante; o un polipéptido recombinante de IL-2 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado

5 comprende una delección de N-terminal, una delección de C-terminal o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la delección del terminal N comprende una delección de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos de N-terminal, en donde

10 las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la delección de C-terminal comprende una delección de los últimos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más residuos de C-terminal, en donde, las posiciones

15 de los residuos son en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130 o 1-125, en donde las posiciones de los residuos son en

20 referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado comprende aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la IL modificada El polipéptido-2 con la

disminución de la potencia de señalización del receptor a IL-2R $\beta\gamma$ es capaz de expandir las células reguladoras T CD4+ (Treg). En algunas realizaciones, el residuo conjugado deteriora o bloquea la potencia de señalización del receptor de IL-2 con IL-2R $\beta\gamma$, o reduce el reclutamiento de la subunidad IL-2R $\beta\gamma$ al complejo IL-2/IL-2R β . En algunas realizaciones, la proliferación de células Treg CD4+ por el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ modificado es equivalente o mayor a la de un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ modificado induce la proliferación de las células Treg CD4+ en una población que es suficiente para modular el curso de una enfermedad en un modelo animal. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor para IL-2R $\beta\gamma$ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2R $\alpha\beta\gamma$, en donde la potencia de señalización del primer receptor es al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, o menor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 de tipo salvaje a IL-2R $\beta\gamma$. En

algunas realizaciones, la potencia de señalización del segundo receptor del polipéptido IL-2 modificado es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 de tipo salvaje a IL-2R $\alpha\beta\gamma$. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado proporciona además un aumento en el reclutamiento de una subunidad IL-2R α al polipéptido IL-2 que conduce a la activación del receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en donde se compara el aumento en el reclutamiento a un reclutamiento de una subunidad IL-2R α por un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado proporciona además una disminución en el reclutamiento de una subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β , en donde el reclutamiento reducido se compara con un reclutamiento de una subunidad IL-2R β o subunidad IL-2R β por un polipéptido IL-2 de tipo salvaje.

[0006] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un polipéptido de interleucina 2 (IL-2) aislado y modificado que comprende al menos un aminoácido no natural en una posición que aumenta el reclutamiento de una subunidad IL-2R α al polipéptido IL-2 que conduce a la activación del receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en donde el aumento en el reclutamiento se compara con un reclutamiento de una subunidad IL-2R α por un polipéptido IL-2 de tipo

salvaje. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51,

5 E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la

10 numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126,

15 S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos uno no natural todos los aminoácidos se seleccionan entre P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48,

20 A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y T113, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas

realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1.

- 5** En algunas realizaciones, la posición de al menos un amino no natural el ácido se selecciona de K8, K9 y H16, en donde, la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de Q22, N26,
- 10** N88, y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de E15, D20, D84 y E95, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la
- 15** SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de L12, L19 y M23, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona
- 20** de Q22 y N26, en donde, la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural: es un análogo de lisina; es un análogo de cisteína o un análogo de histidina; comprende una cadena lateral aromática; comprende

un grupo azido; comprende un grupo alquino; o comprende un grupo aldehído o cetona. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural no comprende una cadena lateral aromática. En algunas realizaciones, el al menos un

5 aminoácido no natural comprende N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, lisina norborneno, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonil lisina, ácido oxononanóico 2-amino-8, ácido oxooctanóico 2-amino-8, p-acetil-L-fenilalanina,

10 p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), p-yodo-L-fenilalanina, m-acetilfenilalanina, ácido oxononanóico 2-amino-8, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azidolanina, fenilalanina p-acil-L-

15 fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-alil-tirosina, O-metil-L-tirosina, O-4- alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfonotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonoserina, L-3-(2-naftil) alanina, 2-amino-

20 ácido propanóico 3-((2-((3-(benciloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil), 2-amino-3-(fenilselanil) propanóico o selenocisteína. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora al polipéptido IL-2 modificado por un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal.

En algunas realizaciones, el ARNt ortogonal del par de sintetasa/ARNt ortogonal comprende al menos una nucleobase no natural. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado se une covalentemente a un residuo conjugado a través del al menos un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el residuo conjugante comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquil), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfenceno, polioxazolinás (POZ), poli(N-acriloilmorfolina), o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una molécula de PEG. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es un PEG lineal. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es un PEG ramificado. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o hidroxietilalmidón (HES). En algunas realizaciones, el lípido

- comprende un ácido graso. En algunas realizaciones, el ácido graso comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 átomos de carbono, de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el ácido graso es un ácido graso saturado. En algunas realizaciones,
- 15** la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, la proteína comprende un anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo comprenden una porción Fc de un anticuerpo.
- 20** En algunas realizaciones, el péptido comprende un péptido XTEN, un polímero de homoaminoácido rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunas realizaciones, el residuo

conjugado se une indirectamente al menos un aminoácido no natural de la IL-2 modificada a través de un conector. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador homobifuncional, un conector heterobifuncional, un conector de longitud cero, un conector dipéptido escindible o no escindible, un grupo maleimida, un espaciador o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado tiene una disminución en la potencia de señalización del receptor a IL-2R $\beta\gamma$, y la disminución en la potencia de señalización del receptor es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces o más a IL-2R $\beta\gamma$ en relación con un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado es: un fragmento funcionalmente activo de un polipéptido IL-2 de longitud completa; un polipéptido IL-2 recombinante; o un polipéptido recombinante de IL-2 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado comprende una delección de N-terminal, una delección de C-terminal o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la delección del terminal N comprende una delección de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos de N-terminal, en donde,

las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la delección de C-terminal comprende una delección de los últimos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más

5 residuos de la C-terminal, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130, o 1-125,

10 en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado comprende aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido

15 IL-2 modificado con la disminución de la potencia de señalización del receptor α IL-2R $\beta\gamma$ es capaz de expandir las células reguladoras T CD4⁺ (Treg). En algunas realizaciones, el residuo conjugado deteriora o bloquea la potencia de señalización del receptor de IL-2 con IL-2R $\beta\gamma$, o reduce el

20 reclutamiento de la subunidad IL-2R α al complejo IL-2/IL-2R β . En algunas realizaciones, la proliferación de células Treg CD4⁺ por el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ modificado es equivalente o mayor a la de un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ modificado

induce la proliferación de las células Treg CD4+ en una población que es suficiente para modular el curso de una enfermedad en un modelo animal. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de

5 señalización del primer receptor para IL-2R $\beta\gamma$ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2R $\alpha\beta\gamma$, en donde la potencia de señalización del primer receptor es al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100

10 veces, 500 veces, 1000 veces, o menor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 de tipo

15 salvaje a IL-2R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del segundo receptor del polipéptido IL-2 modificado es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 de tipo salvaje a IL-2R $\alpha\beta\gamma$. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado

20 proporciona además un aumento en el reclutamiento de una subunidad IL-2R α al polipéptido IL-2 que conduce a la activación del receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en donde se compara el aumento en el reclutamiento a un reclutamiento de una subunidad IL-2R α por un polipéptido IL-2

de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado proporciona además una disminución en el reclutamiento de una subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β , en donde el reclutamiento reducido se compara con un
5 reclutamiento de una subunidad IL-2R β o subunidad IL-2R β por un polipéptido IL-2 de tipo salvaje.

[0007] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un polipéptido de interleucina 2 (IL-2) aislado y modificado que comprende al menos un aminoácido no natural en
10 una posición que reduce la unión entre el polipéptido de IL-2 modificado y el receptor $\beta\gamma$ (IL de la interleucina 2-2R $\beta\gamma$) o reduce el reclutamiento de una subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β , pero no perjudica la activación del receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en donde la unión reducida se
15 compara con la unión entre un polipéptido IL-2 de tipo salvaje y IL-2R $\beta\gamma$, y en donde el reclutamiento reducido se compara con un reclutamiento de una subunidad IL-2R γ por un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se
20 selecciona de P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101,

21

T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas

5 realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de

10 aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos uno no natural todos los aminoácidos se seleccionan entre P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78,

15 H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y T113, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona

20 de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20,

Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponden a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9 y H16, en donde

5 la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de Q22, N26, N88 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la

10 posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de E15, D20, D84 y E95, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de L12, L19 y M23, en donde la

15 numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de Q22 y N26, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la

20 posición de al menos un aminoácido no natural está en Q22, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural está en N26, en donde la numeración del aminoácido los residuos corresponden

a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural: es un análogo de lisina; es un análogo de cisteína o un análogo de histidina; comprende una cadena lateral aromática; comprende un grupo azido; o comprende un

5 grupo aldehído o cetona. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural no comprende una cadena lateral aromática. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, lisina

10 norborneno, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxycarbonil lisina, ácido oxononanóico 2-amino-8, ácido oxooctanóico 2-amino-8, p-acetil-L-fenilalanina, p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), p-yodo-L-fenilalanina, m-acetilfenilalanina, ácido oxononanóico 2-amino-8, p-

15 propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acilo-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-

20 metil-L-tirosina, O-4-allyl-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfonotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonoserina, L-3-(2-naftil) alanina, 2-amino-3-((2- Ácido ((3-(benciloxi)-3-oxopropil) amino)etil) selanil)propanóico, 2-amino-3-(fenilo selanil)propanóico o selenocisteína. En

algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora al polipéptido IL-2 modificado por un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. En algunas realizaciones, el ARNt ortogonal del par de sintetasa/ARNt ortogonal comprende

5 al menos una nucleobase no natural. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado se une covalentemente a un residuo conjugado a través del al menos un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el residuo conjugante comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una

10 proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico),

15 poli(hidroxialquilmecrilamida), poli(mecrilato de hidroxialquil), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfenceno, polioxazolinaz (POZ), poli(N-acriloilmorfolina), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua

20 comprende una molécula de PEG. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es un PEG lineal. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es un PEG ramificado. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido

comprende dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o hidroxietilalmidón (HES). En algunas realizaciones, el lípido comprende un ácido graso. En algunas realizaciones, el ácido

5 graso comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 18

10 átomos de carbono, de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20

15 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el ácido graso es un ácido graso saturado. En algunas realizaciones, la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, la proteína

20 comprende un anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo comprenden una porción Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el péptido comprende un péptido XTEN, un polímero de homoaminoácido rico en glicina (HAP), un

polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP),
 un péptido CTP o un polímero de proteína similar a la
 gelatina (GLK). En algunas realizaciones, el residuo
 conjugado se une indirectamente al menos un aminoácido no
 5 natural de la IL-2 modificada a través de un conector. En
 algunas realizaciones, el conector comprende un conector
 homobifuncional, un conector heterobifuncional, un conector
 de longitud cero, un conector dipéptido escindible o no
 escindible, un grupo maleimida, un espaciador o una
 10 combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la
 disminución en la unión es aproximadamente 10%, 20%, 30%,
 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más disminución en
 la unión a IL-2R $\beta\gamma$ en relación con un polipéptido IL-2 de
 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la disminución de la
 15 unión es de aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces,
 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30
 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces,
 500 veces, 1,000 veces o más a IL-2R $\beta\gamma$ con respecto a un
 polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones,
 20 la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es
 aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,
 95%, 99%, o más disminución relativo a un polipéptido IL-2 de
 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la disminución en el
 reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 1

vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1,000 veces o más en relación con un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas

5 realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado es: un fragmento funcionalmente activo de un polipéptido IL-2 de longitud completa; un polipéptido IL-2 recombinante; o un polipéptido recombinante de IL-2 humano. En algunas

10 realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado comprende una delección de N-terminal, una delección de C-terminal o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la delección de N-terminal comprende una delección de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos de N-terminal, en donde, las posiciones de los

15 residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la delección de C-terminal comprende una delección de los últimos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más residuos de la C-terminal, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las

20 posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130, o 1-125, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado comprende aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado con la

5 disminución de la afinidad de unión a IL-2R $\beta\gamma$ i s capaz de expandir las células reguladoras T CD4⁺ (Treg). En algunas realizaciones, el residuo conjugado deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2R $\beta\gamma$, o reduce el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β . En algunas

10 realizaciones, la proliferación de células Treg CD4⁺ por el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ modificado es equivalente o mayor a la de un polipéptido IL-2 de tipo salvaje.

[0008] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un conjugado de interleucina 2 (IL-2) que comprende:

15 un polipéptido de IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en un residuo de aminoácido seleccionado de P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50,

20 T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la

numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y T113, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de al menos un aminoácido no natural se selecciona de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el aminoácido la posición se selecciona entre K8, K9 y H16. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de Q22, N26, N88 y Q126. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de E15, D20, D84 y E95. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se

selecciona de L12, L19, M23 y F78. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de Q22 y N26. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos está en Q22. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos

5 está en N26. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido seleccionado de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, F78, D84, N88, E95 y Q126 se muta adicionalmente a lisina, cisteína o histidina. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido está mutado a

10 cisteína. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido está mutado a lisina. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido seleccionado de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, F78, D84, N88, E95 y Q126 se muta adicionalmente a un aminoácido no natural. En algunas

15 realizaciones, el aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil) alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-

20 O-acetil-GlcNAcp-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-bromofenilalanina amino-L-fenilalanina o isopropil-L-fenilalanina. En algunas

realizaciones, el residuo de aminoácido mutado adicional se une a un residuo conjugante adicional. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida a la subunidad β del receptor IL-2 (IL-2R β), la subunidad γ del receptor IL-2 (IL-2R γ), o una combinación de los mismos, en relación con una IL de tipo salvaje 2 polipéptido. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% de disminución en la afinidad de unión a IL-2R β , IL-2R γ , o una combinación de las mismas, en relación con un polipéptido salvaje tipo IL-2. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más relativo a un polipéptido de tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones, el residuo conjugado deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2R β , IL-2R γ , o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo conjugado modula hacia abajo. En algunas realizaciones, el residuo conjugado extiende la vida media sistémica del polipéptido sin afectar su afinidad por las cadenas α , β y γ del receptor de IL-2. En algunas realizaciones, el residuo conjugante comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el residuo conjugante adicional comprende un polímero soluble en agua.

En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfenceno, polioxazolinas (POZ), poli(N-acriloilmorfolina), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente PEG. En algunas realizaciones, el PEG es un PEG lineal o un PEG ramificado. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o hidroxietilalmidón (HES). En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente un glicano. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente poliamina. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende una proteína. En algunas realizaciones, el residuo conjugante adicional

comprende una proteína. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas comprende independientemente una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas comprende independientemente una

5 porción Fc. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas comprende independientemente una porción Fc de IgG. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un polipéptido. En algunas realizaciones, el residuo conjugante adicional comprende un polipéptido. En algunas realizaciones,

10 cada uno de los polipéptidos comprende independientemente un péptido XTEN, un polímero homoaminoácido rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o una proteína similar a la gelatina (GLK) polímero. En algunas realizaciones, el

15 polipéptido IL-2 aislado y purificado se modifica por glutamilación. En algunas realizaciones, el residuo conjugado se une directamente al polipéptido IL-2 aislado y purificado. En algunas realizaciones, el residuo conjugado se une indirectamente al polipéptido IL-2 aislado y purificado a

20 través de un conector. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador homobifuncional. En algunas realizaciones, el enlazador homobifuncional comprende reactivo de Lomant ditiobis(propionato de succinimidilo) DSP, 3'3'-ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP),

suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de
 bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartrato de disuccinimidilo
 (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo DST),
 etilenglicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de
 5 disuccinimidilo (DSG), N,N'-disuccinimidilo dimetilcarbonato
 (DSC), carbonato de dimetilo (DMA), dimetil pimelimidato
 (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-
 ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-
 piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano
 10 (BMH), compuesto que contiene haluro de arilo (DFDNB), como
 por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno o 1,3-difluoro-
 4,6-dinitrobenceno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona
 (DFDNPS), bis- $[\beta$ -(4-azidosalicilamido)etil] disulfuro
 (BASED), formaldehído, glutaraldehído, 1,4-butanodiol
 15 diglicidil éter, dihidrazida de ácido adípico,
 carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbencidina,
 bencidina, α,α' -p-diaminodifenilo, ácido xilenosulfónico
 diyodo-p, N,N'-etileno-bis(yodoacetamida) o N,N'-
 hexametileno-bis(yodoacetamida). En algunas realizaciones, el
 20 enlazador comprende un enlazador heterobifuncional. En
 algunas realizaciones, el enlazador heterobifuncional
 comprende N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato
 (SPDP), N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato de
 cadena larga (LC-SPDP), N-succinimidilo 3-(2-

piridilditio)propionato de cadena larga soluble en agua
 (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-
 piridilditio)tolueno (SMPT), sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -
 (2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT),
5 succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato
 (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-
 carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-
 hidroxisuccinimida (MB), éster de m-maleimidobenzoil-N-
 hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MB), N-succinimidilo (4-
10 yodoacteil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidilo (4-
 iozoato de sodio)-sIAB), succinimidil-4-(p-
 maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-
 maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), N-(γ -
 maleimidobutiriloxi)succinimida éster (GMBs), N-(γ -
15 maleimidobutiriloxi) éster de sulfosuccinimida (sulfo-GMB),
 succinimidilo 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX),
 succinimidilo 6-[6-
 ((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX),
 succinimidilo 4-(((yodoacetil)amino)metil) ciclohexano-1-
20 carboxilato (sIAC), succinimidilo 6-((((4-
 yodoacetil)amino)metil) ciclohexano-1-
 carbonil)amino)hexanoato (sIACX), yodoacetato de p-
 nitrofenilo (NPiA)), reticuladores reactivos con carbonilo y
 sulfhidrilo como la hidrazida de ácido butírico 4-(4-N-

- maleimidofenil) (MPBH), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio)propionilhidrazida (PDPH), ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHs-AsA), ácido
- 5** salicílico N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azido (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccina 2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-
- 10** azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NO), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND),
- 15** N-succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidilo (4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidilo 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidilo 2-(7-azido-4-metilcoumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED),
- 20** sulfosuccinimidilo 7-azido-4-metilcumarin-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida

(APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, p-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (AsBA) o p-azidofenil glioxal (APG). En algunas realizaciones, el conector comprende un conector escindible, que comprende

5 opcionalmente un conector dipéptido. En algunas realizaciones, el conector de dipéptido comprende Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala o Val-Lys. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador no escindible. En algunas realizaciones, el conector comprende un grupo maleimida, que

10 comprende opcionalmente maleimidocaproil (mc), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sMCC) o sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC). En algunas realizaciones, el conector comprende además un separador. En algunas

15 realizaciones, el separador comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobenzioxycarbonilo (PABC), un derivado o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, el residuo conjugado es capaz de extender la vida media en suero del conjugado de IL-2. En algunas realizaciones, el residuo

20 conjugante adicional es capaz de extender la vida media en suero del conjugado de IL-2.

[0009] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un conjugado de interleucina 2 (IL-2) que comprende: un polipéptido de IL-2 aislado y purificado; y un residuo

conjugante; en donde el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida por la subunidad β del receptor IL-2 (IL-2R β), la subunidad γ del receptor IL-2 (IL-2R γ), o una combinación de los mismos, con respecto a un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el residuo conjugado está unido a un residuo de aminoácido que interactúa con IL-2R β o IL-2R γ . En algunas realizaciones, el residuo conjugado está unido a un residuo de aminoácido seleccionado de K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el residuo conjugante comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el residuo conjugante adicional comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfenceno, polioxazolinas (POZ), poli(N-acriloilmorfolina), o una

combinación de los mismos. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente PEG. En algunas realizaciones, el PEG es un PEG lineal o un PEG ramificado. En algunas realizaciones,

5 cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o hidroxietilalmidón (HES). En algunas

10 realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente un glicano. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente poliamina. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende una proteína.

15 En algunas realizaciones, el residuo conjugante adicional comprende una proteína. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas comprende independientemente una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas comprende independientemente una

20 porción Fc. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas comprende independientemente una porción Fc de IgG. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un polipéptido. En algunas realizaciones, el residuo conjugante adicional comprende un polipéptido. En algunas realizaciones,

cada uno de los polipéptidos comprende independientemente un péptido XTEN, un polímero homoaminoácido rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o una proteína similar a la

5 gelatina (GLK) polímero. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y purificado se modifica por glutamilación. En algunas realizaciones, el residuo conjugado se une directamente al polipéptido IL-2 aislado y purificado. En algunas realizaciones, el residuo conjugado se une

10 indirectamente al polipéptido IL-2 aislado y purificado a través de un conector. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador homobifuncional. En algunas realizaciones, el conector homobifuncional comprende el reactivo de Lomant ditiobis(propionato de succinimidilo) DSP,

15 3'3'-ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP), suberato de disuccinimidilo (DSS), bis(sulfosuccinimidilo) suberato (BSST), disuccina (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo DST), glicolbis de etileno (succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de disuccinimidilo

20 (DSG), N,N'-disuccinimidilo carbonato (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP, dimetil (DMP), DMS)), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidoheptano (BMH), compuesto que contiene haluro de

arilo (DFDNB), como por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno o 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenceno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil] disulfuro (BASED), formaldehído, glutaraldehído, 1,4-butanodiol diglicidil éter, dihidrazida de ácido adípico, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbencidina, bencidina, α,α' -p-diaminodifenilo, diyodo-ácido p-xilenosulfónico, N,N'-etileno-bis(yodoacetamida) o N,N'-hexametileno-bis(yodoacetamida). En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador heterobifuncional. En algunas realizaciones, el enlazador heterobifuncional comprende N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-SPDP), N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga soluble en agua (sulfo-LC-SPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MB), N-succinimidilo (4-yodoacteil)aminobenzoato (sIAB),

- sulfosuccinimidilo (4-iozoato de sodio)-SIAB),
 succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB),
 sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB),
 N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida éster (GMBs), N-(γ -
5 maleimidobutiriloxi) éster de sulfosuccinimida (sulfo-GMB),
 succinimidilo 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (SIAX),
 succinimidilo 6-[6-
 ((yodoacetil)amino)hexanoil]amino]hexanoato (SIAXX),
 succinimidilo 4-(((yodoacetil)amino)metil) ciclohexano-1-
10 carboxilato (SIAC), succinimidilo 6-((((4-
 yodoacetil)amino)metil) ciclohexano-1-
 carbonil)amino)hexanoato (SIACX), yodoacetato de p-
 nitrofenilo (NPIA), enlaces cruzados reactivos con carbonilo
 y reactivos con sulfhidrilo como 4-hidrazida de ácido
15 butírico(4-N-maleimidofenil) (MPBH), 4-(N-maleimidometil)
 ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-
 piridilditio)propionilhidrazida (PDPH), Ácido salicílico N-
 hidroxisuccinimidil-4-azido (NHs-AsA), ácido salicílico N-
 hidroxisulfosuccinimidil-4-azido (sulfo-NHs-AsA),
20 sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-
 LC-AsA), sulfosuccinimida(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-
 ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato
 (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-
 HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)

hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NO), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-
5 succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidilo (4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidilo 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidilo 2-(7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED),
10 sulfosuccinimidilo 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida
15 (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, p-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (AsBA) o p-azidofenil glioxal (APG). En algunas realizaciones, el conector comprende un conector escindible, que comprende opcionalmente un conector dipéptido. En algunas
20 realizaciones, el conector de dipéptido comprende Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala o Val-Lys. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador no escindible. En algunas realizaciones, el conector comprende un grupo maleimida, que comprende opcionalmente maleimidocaproil (mc), succinimidil-

4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sMCC) o sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC). En algunas realizaciones, el conector comprende además un separador. En algunas
5 realizaciones, el separador comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobenzioxycarbonilo (PABC), un derivado o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, el residuo conjugado es capaz de extender la vida media en suero del conjugado de IL-2. En algunas realizaciones, el residuo
10 conjugante adicional es capaz de extender la vida media en suero del conjugado de IL-2.

[0010] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe una composición farmacéutica que comprende: un conjugado de IL-2 descrito anteriormente; y un excipiente
15 farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración parenteral.

[0011] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno
20 autoinmune en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de IL-2 descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno autoinmune comprende alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis

autoinmune, dermatomiositis, diabetes tipo 1, artritis idiopática juvenil, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis, esclerosis múltiple, 5 pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, uveítis, vitiligo o granulomatos de Wegener. En algunas realizaciones, el método 10 comprende además administrar un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 y el agente terapéutico adicional se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 y el agente terapéutico adicional se administran secuencialmente. En 15 algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 se administra antes del agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 se administra después de la administración del agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

20 [0012] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un método para expandir la población de células T reguladoras (Treg), que comprende: (a) poner en contacto una célula con un conjugado de IL-2 descrito anteriormente; y (b) interactuar el conjugado IL-2 con las subunidades IL-2R α , IL-

2R β e IL-2R γ para formar un complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$; en donde el conjugado IL-2 tiene una afinidad disminuida a las subunidades IL-2R β o IL-2R γ , o modula hacia abajo el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β ,
 5 o retiene una potencia similar a IL-2 en sus subunidades de receptor α , β y γ , pero extiende su vida media, y en donde el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ estimula la expansión de las células Treg de manera similar o más potente que la IL-2 nativa.

[0013] En este documento, en ciertas realizaciones, se
 10 describe un kit que comprende un conjugado de IL-2 descrito anteriormente; o una composición farmacéutica que comprende un conjugado de IL-2 descrito anteriormente. En algunas realizaciones, también se describe en el presente documento un kit que comprende una molécula de ácido polinucléico que
 15 codifica un polipéptido IL-2 descrito anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0014] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y
 20 ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

[0015] Figura 1

Muestra ejemplos de

		aminoácidos no naturales.
		Esta Figura está adaptada de
		la Figura 2 de Young et al.,
		"Beyond the canonical 20
5		amino acids: expanding the
		genetic lexicon," [Más allá
		de los 20 aminoácidos
		canónicos: expandiendo el
		léxico genético], J. of
10		Biological Chemistry 285
		(15):11039-11044 (2010).
	[0016] Figuras 2A a 2B	Ilustran ejemplos de
		aminoácidos no naturales. La
		Figura 2A ilustra derivados
15		de lisina ejemplares. La
		Figura 2B ilustra derivados
		de fenilalanina ejemplares
	[0017] Figuras 3A a 3D	Ilustran ejemplos de
		aminoácidos no naturales.
20		Estos aminoácidos no
		naturales (UAA) se han
		codificado genéticamente en
		proteínas (Figura 3A- UAA
		# 1-42; Figura 3B- UAA # 43-

5

89; Figura 3C- UAA # 90-128; Figura 3D- UAA # 129-167). Figuras 3A-3D se adoptaron de la Tabla 1 de Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69.

10

[0018] Figuras 4A a 4B

Muestra las curvas de respuesta a la dosis de una variante ejemplar de IL-2 para la señalización de pSTAT5 en células primarias LRS humanas (Figura 4A) y la respuesta de proliferación en poblaciones de CTLL-2 de ratón (Figura 4B).

15

[0019] Figura 5

Muestra el perfil PK mejorado de una molécula ejemplar de IL-2 K35_30kD a dos concentraciones diferentes.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] Las citocinas comprenden una familia de proteínas de señalización celular tales como quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas, factores de necrosis tumoral y otros factores de crecimiento que juegan un papel en la

homeostasis innata y adaptativa de las células inmunes. Las citocinas son producidas por células inmunes como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y mastocitos, células endoteliales, fibroblastos y diferentes células del estroma.

- 5** En algunos casos, las citocinas modulan el equilibrio entre las respuestas inmunes humorales y celulares.

[0021] Las interleucinas son proteínas de señalización que modulan el desarrollo y la diferenciación de linfocitos T y B, células del linaje monocítico, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, megacariocitos y células hematopoyéticas. Las interleucinas son producidas por linfocitos T y B CD4 auxiliares, monocitos, macrófagos, células endoteliales y otros residentes de tejidos. En algunos casos, hay alrededor de 15 interleucinas, interleucinas 1-13, interleucina 15 e interleucina 17.

[0022] La interleucina 2 (IL-2) es una citocina pleiotrópica tipo 1 cuya estructura comprende un haz de cuatro α -hélices de 15,5 kDa. La forma precursora de IL-2 tiene 153 residuos de aminoácidos de longitud, con los primeros 20 aminoácidos formando un péptido señal y los residuos 21-153 formando la forma madura. La IL-2 es producida principalmente por las células T CD4+ después de la estimulación del antígeno y, en menor medida, por las células CD8+, las células Natural Killer (NK) y las células NK T

(NKT), las células dendríticas activadas (DC) y los mastocitos. La señalización de IL-2 ocurre a través de la interacción con combinaciones específicas de subunidades del receptor de IL-2 (IL-2R), IL-2R α (también conocido como CD25), IL-2R β (también conocido como CD122) e IL-2R γ (también conocido como CD132). La interacción de IL-2 con IL-2R α forma el complejo receptor de IL-2 de "baja afinidad" con un K_d de aproximadamente 10^{-8} M. La interacción de IL-2 con IL-2R β e IL-2R γ forma la "afinidad intermedia" del complejo receptor de IL-2 con un K_d de aproximadamente 10^{-9} M. La interacción de IL-2 con las tres subunidades, IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ , forma IL-2 con "alta afinidad" del complejo receptor con un K_d de aproximadamente $>10^{-11}$ M.

[0023] En algunos casos, la señalización de IL-2 a través del complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de "alta afinidad" modula la activación y proliferación de las células T reguladoras. Las células T reguladoras, o células T CD4+CD25+ Foxp3+ reguladoras T (Treg) median el mantenimiento de la homeostasis inmune mediante la delección de células efectoras como las células T CD8+, células auxiliares como las células CD4+ Th1, Th2 y Th17, células B, células NK y células NK T. En algunos casos, las células Treg se generan a partir del timo (células tTreg) o se inducen a partir de células T vírgenes en la periferia (células pTreg). En algunos casos,

las células Treg se consideran el mediador de la tolerancia periférica. De hecho, en un estudio, la transferencia de células T periféricas CD4⁺ empobrecidas en CD25 produjo una variedad de enfermedades autoinmunes en ratones desnudos,

5 mientras que el cotransferencia de células T CD4⁺CD25⁺ suprimió el desarrollo de la autoinmunidad (Sakaguchi, et al., "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25)," [Auto-tolerancia inmunológica mantenida por células T activadas que

10 expresan cadenas alfa (CD25) del receptor de IL-2], J. Immunol. 155 (3):1151-1164 (1995)). El aumento de la población de células Treg regula a la baja la proliferación de células T efectoras y suprime la autoinmunidad y las respuestas antitumorales de células T.

15 [0024] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un método para regular selectivamente las poblaciones distintas de linfocitos (por ejemplo, células T reguladoras) a través de la señalización del receptor de citocina/citocina. En algunos casos, la citocina comprende

20 una interleucina. En algunos casos, la citocina es un conjugado de citocina, por ejemplo, un conjugado de interleucina, un conjugado de interferón o un conjugado de factor de necrosis tumoral. En casos adicionales, descritos aquí comprenden composiciones farmacéuticas y kits que

comprenden uno o más conjugados de citocinas descritos aquí.

[0025] En algunas realizaciones, también se describe en el presente documento un método para regular selectivamente la población de Treg a través de la señalización de IL-2/IL-2R. En algunos casos, IL-2 es un conjugado de IL-2 que tiene una interacción debilitada de IL-2R β e IL-2R γ dentro del complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ en relación con la IL-2 de tipo salvaje, o modula hacia abajo el reclutamiento de IL-2R γ subunidad al complejo IL-2/IL-2R β , o conserva una potencia similar a la IL-2 en sus subunidades de receptor α , β y γ , pero extiende su vida media. En algunas realizaciones, se describen adicionalmente en el presente documento métodos para tratar una enfermedad autoinmune con el uso de un conjugado de IL-2 descrito en este documento. En realizaciones adicionales, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas y kits que comprenden uno o más conjugados de IL-2 descritos en el presente documento.

Conjugados de Citoquinas

[0026] En algunas realizaciones, se describen en el presente documento conjugados de citoquinas. En algunos casos, la citocina comprende una interleucina, un factor de necrosis tumoral, un interferón, una quimiocina o una linfoquina. En algunos casos, la citocina es una interleucina. En algunos casos, la citocina es un interferón. En casos adicionales, la

citocina es un factor de necrosis tumoral.

[0027] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un conjugado de interleucina. Las interleucinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18) e interleucina 21 (IL-21). En algunos casos, aquí se describe un conjugado de interleucina, en donde, la interleucina se selecciona de IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21.

Conjugados de IL-2

[0028] En algunas realizaciones, se describen en el presente documento conjugados de IL-2 modificados en una posición de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 es un polipéptido IL-2 aislado y purificado. En algunos casos, el polipéptido IL-2 es una IL-2 de mamífero, por ejemplo, una proteína IL-2 de roedor o una proteína IL-2 humana. En algunos casos, el polipéptido IL-2 es una proteína IL-2 humana. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la IL del polipéptido-2, comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el polipéptido IL-2 consiste en la

secuencia de SEQ ID NO: 1. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 comprende aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2.

[0029] En algunos casos, el polipéptido IL-2 es una variante truncada. En algunos casos, el truncamiento es una delección de N-terminal. En otros casos, el truncamiento es una delección de C-terminal. En casos adicionales, el truncamiento comprende las delecciones N-terminal y C-terminal. Por ejemplo, el truncamiento puede ser una delección de al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más residuos de ya sea la N-terminal o la C-terminal, o ambas terminales. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 2 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 3

residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 4
residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 5
5 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 6
residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 7
residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
10 delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 8
residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 9
residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una
delección de N-terminal de al menos o aproximadamente 10
15 residuos.

[0030] En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 es
un fragmento funcionalmente activo. En algunos casos, el
fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 10-
133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125,
20 30-125, 1-130, o 1-125, en donde las posiciones de los
residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1.
En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo
comprende la región IL-2 10-133, en donde las posiciones de
los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO:

1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 20-133, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el funcionalmente activo el fragmento
- 5** comprende la región IL-2 30-133, en donde las posiciones de los residuos están en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 10-125, en donde las posiciones de los residuos están en referencia a las
- 10** posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 20-125, en donde las posiciones de los residuos están en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-2 1-
- 15** 130, en donde las posiciones de residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunos casos, funcionalmente el fragmento activo comprende la región IL-2 1-125, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1.
- 20** [0031] En algunas realizaciones, un conjugado de IL-2 descrito en el presente documento que comprende un polipéptido de IL-2 aislado y purificado y un residuo conjugado tiene una afinidad disminuida a la subunidad del receptor de IL-2 β (IL-2R β), receptor de IL-2 γ (Subunidad

IL-2R γ), o una combinación de los mismos, en relación con un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 tiene un reclutamiento reducido de la subunidad IL-2R γ para el complejo IL-2/IL-2R β , en relación

5 con un polipéptido de tipo salvaje IL-2. En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que interactúa con IL-2R β (por ejemplo, en la interfaz IL-2/IL-2R β), con IL-2R γ (por ejemplo, en IL-2/IL- Interfaz 2R β), o una combinación de los mismos. En algunos casos, el residuo

10 conjugado se une a un residuo de aminoácido que está próximo a la interfaz IL-2/IL-2R β , la interfaz IL-2/IL-2R β o la interfaz IL-2R $\beta\gamma$. En algunos casos, el residuo de aminoácido está a aproximadamente 5 Å, aproximadamente 10 Å, aproximadamente 15 Å o aproximadamente 20 Å de la interfaz

15 IL-2/IL-2R β , la interfaz IL-2/IL-2R β o la interfaz IL-2R $\beta\gamma$. Como se usa en el presente documento, los residuos de IL-2 implicados en la interfaz IL-2/IL-2R β , la interfaz IL-2/IL-2R β o la interfaz IL-2R $\beta\gamma$ comprenden residuos IL-2 que forman interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, o

20 interacciones iónicas con residuos de la subunidad IL-2R β , la subunidad IL-2R γ , o residuos en la interfaz IL-2R $\beta\gamma$.

[0032] En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido seleccionado de una posición de aminoácido P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15,

H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en los que la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona entre K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y T113. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de K8, K9 y H16. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de Q22, N26, N88 y Q126. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de E15, D20, D84 y E95. En algunos casos, la

posición del aminoácido se selecciona de L12, L19 y M23. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de Q22 y N26. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K8. En algunos casos, la posición de los aminoácidos

5 está en K9. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en Q11. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L12. En algunos casos, la posición del aminoácido está en E15. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en H16. En algunos casos, la posición de los aminoácidos

10 está en L18. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L19. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en D20. En algunos casos, la posición del aminoácido está en Q22. En algunos casos, la posición del aminoácido está en M23. En algunos casos, la posición de los aminoácidos

15 está en N26. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en R81. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en D84. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en S87. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en N88. En algunos casos, la posición de los aminoácidos

20 está en V91. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en I92. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L94. En algunos casos, la posición del aminoácido está en E95. En algunos casos, la posición del aminoácido está en E116. En algunos casos, la posición de los

aminoácidos está en N119. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en R120. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T123. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en A125. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en Q126. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en S127. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en S130. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T131. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L132. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T133.

[0033] En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende además una mutación adicional. En tales casos, el aminoácido se conjuga con un residuo conjugante adicional para aumentar la vida media en suero, la estabilidad o una combinación de los mismos. Alternativamente, el aminoácido se muta primero a un aminoácido natural tal como lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina o tirosina; o a un aminoácido no natural antes de unirse al residuo conjugante adicional.

[0034] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 tiene una afinidad de unión disminuida a la subunidad β del receptor de IL-2 (IL-2R β), la subunidad del receptor γ de IL-2 (IL-2R γ), o una combinación de los mismos, de la IL

Complejo-2R $\alpha\beta\gamma$, relativo a un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, la afinidad disminuida del conjugado de IL-2 a la subunidad β del receptor de IL-2 (IL-2R β), la subunidad del receptor γ de IL-2 (IL-2R γ), o una

5 combinación de ambos, en relación con una IL de tipo salvaje 2 polipéptido, es aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más del 99%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente el 10%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de

10 aproximadamente el 20%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente el 40%. En algunos casos, la afinidad disminuida es de aproximadamente el 50%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente el 60%. En algunos casos, la disminución de

15 la afinidad es de aproximadamente el 80%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente el 90%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente el 99%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es superior al 99%. En algunos casos, la

20 disminución de la afinidad es de aproximadamente el 80%. En algunos casos, la afinidad disminuida es de aproximadamente el 100%.

[0035] En algunas realizaciones, la afinidad de unión disminuida del conjugado de IL-2 a la subunidad β del

receptor de IL-2 (IL-2R β), la subunidad del receptor de IL-2 γ (IL-2R γ), o una combinación de los mismos, en relación con una El polipéptido IL-2 de tipo salvaje es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8

5 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1,000 veces o más. En algunos casos, la afinidad disminuida es aproximadamente 1 vez. En algunos casos, la disminución de la afinidad es aproximadamente 2 veces mayor. En algunos casos, la

10 disminución de la afinidad es aproximadamente 4 veces mayor. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 5 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 6 veces. En algunos casos, la afinidad disminuida es de aproximadamente 8 veces. En

15 algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 10 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 30 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 50 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de

20 aproximadamente 100 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 300 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 500 veces. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente 1000 veces. En algunos casos, la

disminución de la afinidad es más de 1,000 veces.

[0036] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 tiene un reclutamiento reducido de la subunidad IL-2R γ para el complejo IL-2/IL-2R β . En algunos casos, el reclutamiento

5 reducido se compara con un reclutamiento de la subunidad IL-2R γ por un polipéptido IL-2 equivalente sin el aminoácido no natural (por ejemplo, un polipéptido IL-2 de tipo salvaje). En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%,

10 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o mayor que Disminución del 99% con respecto a un polipéptido IL-2 equivalente sin la modificación de aminoácidos no natural. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 10%. En algunos casos, la disminución en el

15 reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente el 20%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente el 40%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente el 50%. En algunos casos, la

20 disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente del 60%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente del 70%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente del 80%. En algunos

- casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 90%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente el 99%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es superior al 99%. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente el 100%. En algunos casos, el conjugado de IL-2 tiene además un aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α .
- 10** [0037] En algunas realizaciones, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1,000 veces o más en
- 15** relación con un polipéptido IL-2 equivalente sin la modificación de aminoácidos no naturales (por ejemplo, un polipéptido IL-2 de tipo salvaje). En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 1 vez. En algunos casos, la disminución en el
- 20** reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 2 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 4 veces mayor. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 5 veces. En algunos

casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es aproximadamente 6 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 8 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 10 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 30 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 50 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 100 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 300 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 500 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es de aproximadamente 1000 veces. En algunos casos, la disminución en el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ es más de 1,000 veces. En algunos casos, el conjugado de IL-2 tiene además un aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α .

[0038] En algunas realizaciones, el conjugado IL-2 tiene un aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α al polipéptido IL-2. En algunos casos, el reclutamiento reducido se compara con un reclutamiento de la subunidad IL-2R α por un

polipéptido IL-2 equivalente sin el aminoácido no natural (por ejemplo, un polipéptido IL-2 de tipo salvaje). En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o mayor que Aumento del 99% con respecto a un polipéptido IL-2 equivalente sin la modificación de aminoácidos no natural. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 10%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 20%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 40%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 50%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente del 60%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 70%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 80%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 90%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 99%. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es superior al 99%. En algunos casos, el aumento en el

reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente el 100%. En algunos casos, el conjugado de IL-2 tiene además una disminución en el reclutamiento de una subunidad IL-2R β o una subunidad IL-2R γ .

- 5** [0039] En algunas realizaciones, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1,000 veces o más en
- 10** relación con un polipéptido IL-2 equivalente sin la modificación de aminoácidos no naturales (por ejemplo, un polipéptido IL-2 de tipo salvaje). En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 1 vez. En algunos casos, el aumento en el
- 15** reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 2 veces. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 4 veces mayor. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 5 veces mayor. En algunos casos, el
- 20** aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 6 veces mayor. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 8 veces mayor. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 10

veces. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 30 veces. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es aproximadamente 50 veces mayor. En algunos casos, el

5 aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 100 veces. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 300 veces. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 500 veces. En

10 algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es de aproximadamente 1000 veces. En algunos casos, el aumento en el reclutamiento de la subunidad IL-2R α es más de 1,000 veces. En algunos casos, el conjugado de IL-2 tiene además una disminución en el reclutamiento de una subunidad

15 IL-2R β o una subunidad IL-2R γ .

[0040] En algunas realizaciones, un polipéptido de IL-2 descrito en este documento tiene una disminución en la potencia de señalización del receptor a IL-2R $\beta\gamma$. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del

20 receptor es de aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10-veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces o más a IL-2R $\beta\gamma$ en relación con un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, la

disminución en la potencia de señalización del receptor es aproximadamente 2 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 5 veces. En algunos casos, la disminución en

5 la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 10 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 20 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de

10 aproximadamente 30 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 40 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 50 veces. En algunos casos, la disminución en

15 la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 100 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 200 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de

20 aproximadamente 300 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 400 veces. En algunos casos, la disminución en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 500 veces. En algunos casos, la disminución

en la potencia de señalización del receptor es de aproximadamente 1000 veces.

[0041] En algunos casos, la potencia de señalización del receptor se mide por un valor EC50. En algunos casos, la
5 disminución en la potencia de señalización del receptor es un aumento en la CE50. En algunos casos, el aumento de la CE50 es aproximadamente de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces,
10 500 veces, 1000 veces o más en relación con un polipéptido IL-2 de tipo salvaje.

[0042] En algunos casos, la potencia de señalización del receptor se mide por un valor ED50. En algunos casos, la
15 disminución en la potencia de señalización del receptor es un aumento en la DE50. En algunos casos, el aumento en ED50 es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces o más en relación con un polipéptido IL-2 de tipo
20 salvaje.

[0043] En algunas realizaciones, un polipéptido de IL-2 descrito aquí tiene una ventana terapéutica expandida en comparación con una ventana terapéutica de un polipéptido de IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, la ventana

terapéutica expandida se debe a una disminución en la unión entre el polipéptido IL-2 y el receptor de interleucina 2 $\beta\gamma$ (IL-2R $\beta\gamma$), una disminución en la potencia de señalización del receptor a IL-2R $\beta\gamma$, una disminución en el reclutamiento de una IL Subunidad-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β , o un aumento en el reclutamiento de una subunidad IL-2R α al polipéptido IL-2. En algunos casos, el polipéptido IL-2 no tiene una activación alterada del receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$).

[0044] En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una primera potencia de señalización del receptor a un complejo de señalización de IL-2 $\beta\gamma$ y una segunda potencia de señalización del receptor a un complejo de señalización de IL-2 $\alpha\beta\gamma$, y en donde una diferencia entre la potencia de señalización del primer receptor y la potencia de señalización del segundo receptor es al menos 1 vez. En algunos casos, la diferencia es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces, o más. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es menor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7

veces, 8 veces, 9 veces, 10- veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o menos que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado tiene una potencia de

5 señalización de receptor más baja a un complejo de señalización de IL-2 $\beta\gamma$ que una potencia de señalización de segundo receptor a un complejo de señalización de IL-2 $\alpha\beta\gamma$. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es al menos 1 veces

10 menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces o

15 500 veces menor que una potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor y la potencia de señalización del segundo receptor son ambas más bajas que las potencias respectivas del polipéptido IL-2 de tipo salvaje,

20 pero la potencia de señalización del primer receptor es menor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la diferencia entre la potencia de señalización del primer receptor y la potencia de señalización del segundo receptor aumenta la ventana

terapéutica para el polipéptido IL-2 modificado.

[0045] En algunas realizaciones, el residuo de conjugación está unido al N-terminal o al C-terminal de un polipéptido IL-2, directa o indirectamente a través de un péptido conector. En algunos casos, el residuo conjugado (por ejemplo, Un polímero, una proteína o un péptido) se fusiona genéticamente con la IL-2, en la N-terminal o la C-terminal de IL-2, y directa o indirectamente a través de un péptido conector. En algunos casos, el residuo conjugado está unido al residuo de aminoácido N-terminal o C-terminal. En algunos casos, el residuo conjugado está unido a un grupo reactivo que está unido al residuo de aminoácido N-terminal o C-terminal.

[0046] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas o más. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática de más de 1 hora. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media

plasmática de más de 2 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 3 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 4 horas. En

5 algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 5 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática de más de 6 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más

10 de 7 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática de más de 8 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática de más de 9 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media

15 en plasma de más de 10 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 12 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de más de 18 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una

20 vida media plasmática de más de 24 horas.

[0047] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24 horas, 2

días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 5 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24 horas o más. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 1 hora. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 2 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 10 comprende una vida media en plasma de al menos 3 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 4 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 5 horas. En algunas realizaciones, el 15 conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 6 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 7 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 8 horas. En algunas 20 realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 9 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 10 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 12 horas. En

algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 18 horas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de al menos 24 horas.

- 5** [0048] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 24 horas a
- 10** aproximadamente 7 días, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 2 días a
- 15** aproximadamente 3 días.

- [0049] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media en plasma de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 2 horas a
- 20** aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 4 horas a

aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 6 horas a
aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 6 horas a
aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 6 horas a
aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 6 horas a
5 aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a
aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 8 horas a
aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 8 horas a unas
10 horas.

[0050] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2
10 comprende una vida media en plasma que es capaz de proliferar
o expandir una célula Treg, pero no ejerce un efecto nocivo
tal como la apoptosis.

[0051] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2
comprende una vida media plasmática prolongada, por ejemplo,
15 al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas,
7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18
horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7
días o más en relación con una IL-2 de tipo salvaje.

[0052] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2
20 comprende una vida media plasmática prolongada, por ejemplo,
de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 18 horas, de
aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de
aproximadamente 2 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, de

aproximadamente 4 horas a aproximadamente 18 horas, de
aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de
aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de
5 aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 18 horas, de
10 aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, o de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 10 horas en
relación con una IL-2 de tipo salvaje.

[0053] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2
comprende una semivida plasmática prolongada con una
15 toxicidad reducida. En algunos casos, el conjugado de IL-2
comprende una vida media plasmática prolongada de al menos 1
hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8
horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24
horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más
20 con una toxicidad reducida. En algunos casos, el conjugado de
IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada de al
menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7
horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18
horas, 24 horas o más con una toxicidad reducida. En algunos

casos, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 10 horas con una toxicidad reducida. En algunos casos, la toxicidad reducida es al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces o más reducido en relación con una IL2 de tipo salvaje. En algunos casos, la toxicidad reducida es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500 %, o más reducido en relación con una IL-2 de tipo

salvaje.

[0054] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende un residuo conjugado en donde, el tamaño (por ejemplo, el volumen o la longitud) del residuo conjugado

5 mejora la estabilidad plasmática pero no reduce la potencia. En algunos casos, el tamaño del residuo conjugado extiende la vida media del plasma al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4

10 días, 5 días, 6 días, 7 días o más. En algunos casos, el tamaño del residuo conjugado extiende la vida media del plasma al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24 horas o más. En algunos casos, el tamaño

15 del residuo conjugado extiende la vida media plasmática de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, de

20 aproximadamente 4 horas a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas, de

- aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 18 horas, de
5 aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, o de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 10 horas. En
algunos casos, el tamaño del residuo conjugado reduce la
potencia en menos del 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en relación
con una IL-2 de tipo salvaje.
- 10** [0055] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2
comprende un residuo conjugado en donde, el tamaño (por
ejemplo, el volumen o la longitud) del residuo conjugado
mejora la estabilidad y la potencia del plasma. En algunos
casos, el tamaño del residuo conjugado extiende la vida media
15 del plasma al menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5
horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12
horas, 15 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días,
5 días, 6 días, 7 días o más. En algunos casos, el tamaño del
residuo conjugado extiende la vida media del plasma al menos
20 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas,
8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 24
horas o más. En algunos casos, el tamaño del residuo
conjugado extiende la vida media plasmática de
aproximadamente 1 hora a aproximadamente 18 horas, de

aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, de
aproximadamente 2 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 2 horas a aproximadamente 8 horas, de
aproximadamente 4 horas a aproximadamente 18 horas, de
5 aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas, de
aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 18 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas, de
10 aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 horas, de
aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 18 horas, de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, o de
aproximadamente 8 horas a aproximadamente 10 horas. En
15 algunos casos, el tamaño del residuo conjugado mejora aún más
la potencia en más del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,
80%, 90%, 100%, 200% o más en relación con una IL-2 de tipo
salvaje.

[0056] En algunos casos, el residuo conjugado deteriora
20 o bloquea la potencia de señalización del receptor de IL-2
con IL-2R $\beta\gamma$, o reduce el reclutamiento de la subunidad IL-2R γ
al complejo IL-2/IL-2R β .

[0057] En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado
con la disminución de la potencia de señalización del

receptor a IL-2R $\beta\gamma$ es capaz de expandir las células reguladoras T CD4⁺ (Treg).

[0058] En algunas realizaciones, la proliferación de células Treg CD4⁺ por el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ modificado es
5 equivalente o mayor a la de un polipéptido IL-2 de tipo salvaje.

[0059] En algunas realizaciones, el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ induce la proliferación de las células Treg CD4⁺ en una población que es suficiente para modular el curso de una
10 enfermedad en un modelo animal.

[0060] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento una proteína de unión al receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en la que la potencia de señalización del receptor para un receptor de interleucina 2
15 $\beta\gamma$ (IL-2R $\beta\gamma$) de dicha proteína de unión es menor que la de la proteína salvaje tipo IL-2 humano (hIL-2), y en donde dicha proteína de unión comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, dicha proteína de unión es un polipéptido IL-2 modificado o un fragmento funcionalmente
20 activo del mismo, en donde, el polipéptido IL-2 modificado comprende al menos un aminoácido no natural.

[0061] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento una proteína de unión al receptor de $\alpha\beta\gamma$ de interleucina 2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en la que el reclutamiento de

una subunidad IL-2R γ a un complejo IL-2/IL-2R β por dicha proteína de unión es menor que eso de IL-2 humana de tipo salvaje (hIL-2), y en donde dicha proteína de unión comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, dicha

5 proteína de unión es un polipéptido IL-2 modificado o un fragmento funcionalmente activo del mismo, en donde, el polipéptido IL-2 modificado comprende al menos un aminoácido no natural.

[0062] En algunas realizaciones, se describe en el

10 presente documento una proteína de unión al receptor de interleucina 2 $\alpha\beta\gamma$ (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), en la que la afinidad de unión por un receptor de interleucina 2 $\beta\gamma$ (IL-2R $\beta\gamma$) de dicha proteína de unión es menor que la del tipo salvaje IL-2 humana (hIL-2), y en donde dicha proteína de unión comprende

15 al menos un aminoácido no natural. En tales casos, dicha proteína de unión es un polipéptido de IL-2 modificado o un fragmento funcionalmente activo del mismo, en donde, el polipéptido de IL-2 modificado comprende al menos un aminoácido no natural.

20 [0063] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ que comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende un aminoácido no natural y un IL-2R $\alpha\beta\gamma$, en donde, el polipéptido IL-2 modificado tiene una potencia de señalización de receptor

reducida hacia IL-2R $\beta\gamma$, y en donde la potencia reducida de señalización del receptor se compara con una afinidad de unión entre un polipéptido IL-2 de tipo salvaje e IL-2R $\beta\gamma$. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado comprende
5 además un residuo conjugado unido covalentemente al aminoácido no natural.

[0064] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ que comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende un aminoácido no
10 natural y una IL-2R $\alpha\beta\gamma$, en donde, un reclutamiento de una subunidad IL-2R γ a una IL- El complejo 2/IL-2R β por dicho polipéptido IL-2 modificado es menor que el de un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado comprende además un residuo conjugado unido
15 covalentemente al aminoácido no natural.

[0065] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ que comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende un aminoácido no natural y un IL-2R $\alpha\beta\gamma$, en donde, el polipéptido IL-2
20 modificado tiene una afinidad de unión reducida hacia IL-2R $\beta\gamma$, y en donde la afinidad de unión reducida se compara con una afinidad de unión entre un polipéptido de IL-2 de tipo salvaje y IL-2R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ que comprende

un polipéptido IL-2 modificado que comprende un aminoácido no natural y una IL-2R $\alpha\beta\gamma$, en donde, un reclutamiento de una subunidad IL-2R γ a una IL-2/IL El complejo-2R β por dicho polipéptido IL-2 modificado es menor que el de un polipéptido

5 IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado comprende además un residuo conjugado unido covalentemente al aminoácido no natural.

[0066] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un activador de células Treg CD4+ que

10 expande selectivamente las células Treg CD4+ en una población celular, en donde, dicho activador comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, dicho activador expande las células T efectoras CD8+ o las células asesinas naturales en

15 menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o 0.1% en la población de células CD3+ cuando dicho activador está en contacto con dicha población de células CD3+, en relación con una expansión de células T efectoras CD8+ o células asesinas naturales en la población de células CD3+ en contacto con un

20 polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En algunos casos, dicha población celular es una población celular in vivo. En algunos casos, dicha población celular es una población celular in vitro. En algunos casos, dicha población celular es una población celular ex vivo.

Conjugados de IL-10

[0067] En algunas realizaciones, se describen en el presente documento conjugados de IL-10 modificados en una posición de aminoácidos. La IL-10, también conocida como factor inhibidor

5 de la síntesis de citocinas humanas o CSIF, es una citocina inmunomoduladora que limita la respuesta inflamatoria contra los patógenos, pero también se ha identificado como una citocina antitumoral debido a su actividad inmunoestimuladora en las células T CD8. La IL-10 regula a la baja la expresión

10 de las citocinas Th1, los antígenos MHC de clase II y las moléculas coestimuladoras en los macrófagos, y mejora aún más la supervivencia de las células B, la proliferación y la producción de anticuerpos. Además, IL-10 puede estimular la proliferación de timocitos y la citotoxicidad de las células

15 T CD8. En algunos casos, el conjugado de IL-10 comprende un polipéptido de IL-10 aislado y purificado y un residuo conjugado. En algunos casos, el conjugado de IL-10 tiene una afinidad disminuida a un receptor de IL-10 en relación con un polipéptido de tipo salvaje de IL-10. En algunos casos, el

20 residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que interactúa con el receptor de IL-10 (por ejemplo, en una interfaz IL-10/IL-10R). En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que está próximo a la interfaz IL-10/IL-10R (por ejemplo, aproximadamente 5 Å,

aproximadamente 10 Å, aproximadamente 15 Å o aproximadamente 20 Å lejos de la IL-10/IL-10R interfaz). Como se usa en el presente documento, los residuos implicados en la interfaz IL-10/IL-10R comprenden residuos de IL-10 que forman

5 interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas con residuos de la IL-10R. En algunos casos, el residuo conjugado está unido al N-terminal o al C-terminal del polipéptido IL-10, ya sea directa o indirectamente a través de un péptido conector. En casos

10 adicionales, el residuo conjugado modula la interacción entre IL-10 e IL-10R para potenciar su actividad inmunosupresora y reducir su actividad inmunoestimuladora. En algunos casos, el conjugado IL-10 regula al alza distintas poblaciones de linfocitos a través de la señalización IL-10/IL-10R. En

15 algunos casos, el conjugado IL-10 modula la actividad inmune.

Conjugados De Citoquinas Adicionales

[0068] En algunas realizaciones, descritas en el presente documento incluyen uno o más conjugados de citocinas adicionales modificados en una posición de aminoácidos. Las

20 citocinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, IL-1 β , IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21. En algunos casos, el conjugado de citocina comprende un polipéptido de citocina aislado y purificado y un residuo conjugado. En algunos casos, el conjugado de citocinas tiene una afinidad

disminuida a su receptor respectivo en relación con una citocina de tipo salvaje. En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que está próximo a la interfaz del receptor (por ejemplo, aproximadamente 5 Å, 5 aproximadamente 10 Å, aproximadamente 15 Å o aproximadamente 20 Å lejos de la interfaz del receptor). En algunos casos, el residuo conjugado se une al N-terminal o al C-terminal del polipéptido de citocina, ya sea directa o indirectamente a través de un péptido conector. En casos adicionales, el 10 residuo conjugado modula la interacción entre la citocina y su receptor para potenciar su actividad inmunosupresora y reducir su actividad inmunoestimuladora. En algunos casos, el conjugado de citoquinas regula al alza distintas poblaciones de linfocitos a través de su señalización del receptor. En 15 algunos casos, el conjugado de citoquinas modula la actividad inmune.

Precursores Conjugados De Citoquinas

[0069] En el presente documento se describen precursores conjugados de citoquinas, que comprenden una citocina mutada 20 (tal como IL-2), en la que uno o más aminoácidos han sido mutados del aminoácido de tipo salvaje. Tales precursores se usan a menudo con los métodos descritos en este documento para el tratamiento de enfermedades o afecciones. En algunas realizaciones, un precursor de citocina no está conjugado.

Dichas mutaciones comprenden diversas adiciones, deleciones o sustituciones. En algunas realizaciones, la mutación comprende la sustitución por un aminoácido natural diferente. En algunos casos, la citocina mutada comprende una mutación

5 en la posición de aminoácidos P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98,

10 S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en los que la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de

15 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46,

20 K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y T113. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre K8, K9, L12, E15, H16, L19,

D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de K8, K9 y H16. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de Q22, N26, N88 y Q126. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de E15, D20, D84 y E95. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de L12, L19 y M23. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de Q22 y N26. En algunas realizaciones, una mutación de citocina comprende un residuo de conjugación, en donde, el residuo de conjugación está unido a un sitio mutado en la citocina mutada.

Fusiones De Proteínas O Péptidos

[0070] En algunas realizaciones, un conjugado de citocina descrito en el presente documento comprende una citocina (por ejemplo, IL-2 u otra citocina) que se fusiona con un péptido o proteína (fusión). En algunas realizaciones, el péptido o proteína es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina descrito en el presente documento comprende una citocina (por ejemplo, IL-2 u otra citocina) que se fusiona con un anticuerpo, o sus fragmentos de unión. En algunas realizaciones, una citocina descrita en el presente documento se fusiona con múltiples proteínas o péptidos. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina comprende una fusión de citocina a una proteína o

péptido, y al menos un residuo conjugante. En algunos casos, un anticuerpo o sus fragmentos de unión comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, anticuerpo

5 quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab2 divalente, F(ab)'3 fragmentos, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo,

10 proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo. Dichas proteínas de fusión en algunos

15 casos se generan directamente a través de la traducción. En algunas realizaciones, las fusiones se generan usando un método químico u otro método de ligadura enzimática. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina comprende un péptido fusionado o una proteína unida por un conector. En

20 algunas realizaciones, el conector es un péptido. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina comprende un péptido N-terminal o una fusión de proteínas. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina comprende un péptido C-terminal o una fusión de proteínas. En algunos casos, la

citocina fusionada con el péptido o la proteína se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación descritos a continuación.

[0071] En algunos casos, el conjugado de citocina
5 comprende una fusión con una fusión scFv, bis-scFv, (scFv)₂, dsFv o sdAb. En algunos casos, la fusión comprende un scFv. En algunos casos, el conjugado de citocina comprende una fusión con bis-scFv. En algunos casos, el conjugado de citoquinas comprende una fusión con (scFv)₂. En algunos
10 casos, el conjugado de citoquinas comprende una fusión con dsFv. En algunos casos, el conjugado de citoquinas comprende una fusión con sdAb. En algunos casos, la citocina fusionada con scFv, bis-scFv, (scFv)₂, dsFv o sdAb se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación
15 descritos a continuación.

[0072] En algunos casos, el conjugado de citocina comprende una fusión con una porción Fc de un anticuerpo, por ejemplo, de IgG, IgA, IgM, IgE o IgD. En algunos casos, el conjugado de citocina comprende una fusión con una porción Fc
20 de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₃ o IgG₄). En algunos casos, la citocina fusionada a la porción Fc se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación descritos a continuación.

[0073] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por

ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se fusiona con un anticuerpo, o sus fragmentos de unión. En algunos casos, el polipéptido de citocina se fusiona con un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino
5 o fragmento de unión del mismo, anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab2 divalente, F(ab)'3 fragmentos, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo,
10 nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo.
15 En casos adicionales, el polipéptido de citocina se fusiona con una porción Fc de un anticuerpo. En casos adicionales, el polipéptido de citocina se fusiona con una porción Fc de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₃ o IgG₄). En algunos casos, la citocina fusionada con el anticuerpo, o sus fragmentos de
20 unión del mismo, se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación descritos a continuación.

[0074] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se fusiona con un anticuerpo, o sus fragmentos de unión. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se fusiona con un anticuerpo

humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab2

5 divalente, F(ab)'3 fragmentos, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de

10 unión del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 se fusiona con una porción Fc de un anticuerpo. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 se fusiona con una porción Fc de IgG (por

15 ejemplo, IgG₁, IgG₃ o IgG₄). En algunos casos, el anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo fusionados con el polipéptido IL-2 no impedirán la unión del polipéptido IL-2 con el IL-2Rβγ. En algunos casos, el anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo fusionados con el polipéptido

20 IL-2 bloquea parcialmente la unión del polipéptido IL-2 con el IL-2Rβγ. En algunos casos, el polipéptido IL-2 fusionado con el anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación descritos a continuación.

Aminoácidos Naturales Y No Naturales

[0075] En algunas realizaciones, un residuo de aminoácido descrito en el presente documento (por ejemplo, dentro de una citocina tal como IL-2) se muta a lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina o tirosina antes de uniéndose a (o reaccionando con) un residuo conjugado. Por ejemplo, la cadena lateral de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina o tirosina puede unirse a un residuo de conjugación descrito en este documento. En algunos casos, el residuo de aminoácido está mutado a cisteína, lisina o histidina. En algunos casos, el residuo de aminoácido está mutado a cisteína. En algunos casos, el residuo de aminoácido está mutado a lisina. En algunos casos, el residuo de aminoácido está mutado a histidina. En algunos casos, el residuo de aminoácido está mutado a tirosina. En algunos casos, el residuo de aminoácido está mutado a triptófano. En algunas realizaciones, un aminoácido no natural no se conjuga con un residuo conjugado. En algunas realizaciones, una citocina descrita en el presente documento comprende un aminoácido no natural, en donde, la citocina se conjuga con la proteína, en la que el punto de unión no es el aminoácido no natural.

[0076] En algunas realizaciones, un residuo de

aminoácido descrito en el presente documento (por ejemplo, dentro de una citocina tal como IL-2) se muta a un aminoácido no natural antes de unirse a un residuo conjugado. En algunos casos, la mutación a un aminoácido no natural previene o

5 minimiza una respuesta de autoantígeno del sistema inmune. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido distinto de los 20 aminoácidos que se encuentran naturalmente en las proteínas. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales

10 incluyen: p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, p-metoxifenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L- 3-(2-naftil) alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-Dopa,

15 fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-boronofenilalanina, O-propargiltirosina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, piflanotirosina, fosfonotirosina, fosfonotirosina, fosfonotirosina

20 selenocisteína, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, azido-lisina (AzK), un análogo no natural de un aminoácido tirosina; un análogo antinatural de un aminoácido glutamina; un análogo antinatural de un aminoácido fenilalanina; un análogo no natural de un aminoácido serina;

un análogo antinatural de un aminoácido treonina; un alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, selenio, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfonio, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o aminoácido sustituido con amino, o una combinación de los mismos; un aminoácido con un reticulante fotoactivable; un aminoácido marcado con spin; un aminoácido fluorescente; un aminoácido de unión a metal; un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radiactivo; un aminoácido fotoenjaulado o fotoisomerizable; una biotina o un análogo de biotina que contiene un aminoácido; un ceto que contiene aminoácidos; un aminoácido que comprende polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con un átomo pesado; un aminoácido químicamente escindible o fotoclavable; un aminoácido con una cadena lateral alargada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con azúcar; un aminoácido que contiene azúcar unido a carbono; un aminoácido redox activo; un ácido que contiene α -hidroxi; un aminoácido tioácido; un aminoácido α,α disustituido; un β -aminoácido; un aminoácido cíclico que no sea prolina o histidina, y un aminoácido aromático que no sea fenilalanina, tirosina o triptófano.

[0077] En algunas realizaciones, el aminoácido no

natural comprende un grupo reactivo selectivo, o un grupo reactivo para el marcado selectivo de sitio de un polipéptido diana. En algunos casos, la química es una reacción biortogonal (por ejemplo, reacciones biocompatibles y selectivas). En algunos casos, la química es una reacción de formación de triazol-alquida-azida catalizada por Cu (I) o "libre de cobre", la reacción de ligadura Staudinger, la reacción inversa de Diels-Alder (IEDDA), "foto-click" química o un proceso mediado por metales como la metátesis de olefina y el acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura o Sonogashira.

[0078] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un grupo fotorreactivo, que reticula, tras la irradiación con, por ejemplo, UV.

[0079] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un aminoácido fotoenjaulado.

[0080] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de aminoácido para-sustituido, meta-sustituido u orto-sustituido.

[0081] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-metoxifenilalanina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil) alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-Dopa,

fluorada fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfofoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina o isopropil-L-fenilalanina.

[0082] En algunos casos, el aminoácido no natural es 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina o 3-yodotirosina.

[0083] En algunos casos, el aminoácido no natural es fenilselenocisteína.

[0084] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de fenilalanina que contiene benzofenona, cetona, yoduro, metoxi, acetilo, benzoilo o azida.

[0085] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que contiene benzofenona, cetona, yoduro, metoxi, acetilo, benzoilo o azida.

[0086] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende una cadena lateral aromática.

[0087] En algunos casos, el aminoácido no natural no comprende una cadena lateral aromática.

[0088] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo azido.

[0089] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo aceptor de Michael. En algunos casos, los

grupos aceptores de Michael comprenden un residuo insaturado capaz de formar un enlace covalente a través de una reacción de adición de 1,2. En algunos casos, los grupos aceptores de Michael comprenden alquenos o alquinos deficientes en 5 electrones. En algunos casos, los grupos aceptores de Michael incluyen, entre otros, alfa, beta, insaturados: cetonas, aldehídos, sulfóxidos, sulfonas, nitrilos, iminas o compuestos aromáticos.

[0090] En algunos casos, el aminoácido no natural es la 10 deshidroalanina.

[0091] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo aldehído o cetona.

[0092] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende un grupo aldehído o cetona.

15 [0093] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende uno o más átomos de O, N, Se o S en la posición beta, gamma o delta. En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende átomos de O, N, Se o S en la posición gamma.

20 [0094] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina en donde, el átomo de épsilon N se reemplaza con un átomo de oxígeno.

[0095] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que no se produce de forma natural en la

lisina modificada postraduccionalmente.

[0096] En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido que comprende una cadena lateral, en donde el sexto átomo de la posición alfa comprende un grupo carbonilo.

- 5** En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido que comprende una cadena lateral, en donde el sexto átomo de la posición alfa comprende un grupo carbonilo, y el quinto átomo de la posición alfa es un nitrógeno. En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido que comprende una
- 10** cadena lateral, en donde el séptimo átomo de la posición alfa es un átomo de oxígeno.

- [0097] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de serina que comprende selenio. En algunos casos, el aminoácido no natural es selenioserina (ácido 2-amino-3-
- 15** hidroselenopropanóico). En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido 2-amino-3-((2-((3-(benciloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil)propanóico. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido 2-amino-3-(fenilselanil)propanóico. En algunos casos, el aminoácido no
- 20** natural comprende selenio, en donde la oxidación del selenio da como resultado la formación de un aminoácido no natural que comprende un alqueno.

[0098] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo ciclooctinilo.

[0099] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo transciclooctenilo.

[0100] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo norbornenilo.

5 [0101] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo ciclopropenilo.

[0102] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo diazirina.

10 [0103] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo tetrazina.

[0104] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina, en donde, el nitrógeno de la cadena lateral está carbamilado. En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina, en donde, el nitrógeno de la cadena lateral está acilado. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido 2-amino-6-[[(terc-butoxi)carbonil]amino} hexanóico. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido 2-amino-6-[[(terc-butoxi)carbonil]amino} hexanóico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N⁶-boc-N⁶-metilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N⁶-acetilsina. En algunos casos, el aminoácido no natural es la pirrolisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N⁶-trifluoroacetilsina. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido hexanóico

2-amino-6-[[(benciloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido hexanóico 2-amino-6-[[(p-yodobenciloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido hexanóico 2-amino-6-[[(p-

5 nitrobenciloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-prolilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido hexanóico 2-amino-6-[[(ciclopentiloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(ciclopentanocarbonil) lisina. En

10 algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(tetrahidrofurano-2-carbonil) lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(3-etiniltetrahidrofuran-2-carbonil) lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((prop-2-in-1-iloxi) carbonil) lisina. En algunos casos,

15 el aminoácido no natural es el ácido hexanóico 2-amino-6-[[(2-azidociclopentiloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((2-azidoetoxi) carbonil) lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido hexanóico 2-amino-6-[[(2-

20 nitrobenciloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido hexanóico 2-amino-6-[[(2-ciclooctiniloxi) carbonil] amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(2-aminobut-3-inilil) lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido 2-amino-

- 6-((2-aminobut-3-inilil) oxi)hexanóico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(aliloxicarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(butenil-4-oxicarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no
- 5** natural es N6-(pentenil-5-oxicarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((but-3-in-1-iloxi)carbonil)-lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(pent-4-in-1-iloxi)carbonil)-lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(tiazolidina-4-
- 10** carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido oxononanóico 2-amino-8. En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido oxooctanóico 2-amino-8. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(2-oxoacetil)lisina.
- 15** [0105] En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-propionilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-butirilisina, En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(but-2-enoil)lisina, En algunos casos, el aminoácido no natural es
- 20** N6-((biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-iloxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((espiro[2.3]hex-1-en-5-ilmetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(((4-(1-(trifluorometil)cicloprop-2-en-1-il)bencil) oxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido

- no natural es N6-((biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilmetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es la cisteinilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)etoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((2-(3-metil-3H-diazirin-3-il)etoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((3-(3-metil-3H-diazirin-3-il)propoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((meta-nitrobeniloxi)N6-metilcarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetoxi)carbonil)-lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((ciclohept-3-en-1-iloxi)carbonil)-L-lisina.
- 15** [0106] En algunos casos, el aminoácido no natural es el ácido 2-amino-3-((((benciloxi)carbonil)amino)metil)selanil)propanóico.
- [0107] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el **20** polipéptido IL) mediante un codón de parada ámbar, opal u ocre reutilizado.
- [0108] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un codón de 4 bases.

[0109] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un codón de sentido raro reutilizado.

- 5** [0110] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un codón sintético que comprende un ácido nucleico no natural. En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina mediante un par ortogonal
- 10** modificado de sintetasa/ARNt. Dichos pares ortogonales comprenden una sintetasa no natural que es capaz de cargar el ARNt no natural con el aminoácido no natural, mientras minimiza la carga de a) otros aminoácidos endógenos sobre el ARNt no natural y b) aminoácidos no naturales sobre otros
- 15** ARNt endógenos. Dichos pares ortogonales comprenden ARNt que pueden ser cargados por la sintetasa no natural, mientras que evitan ser cargados con a) otros aminoácidos endógenos por las sintetasas endógenas. En algunas realizaciones, dichos pares se identifican a partir de diversos organismos, tales
- 20** como bacterias, levaduras, arqueas o fuentes humanas. En algunas realizaciones, un par de sintetasa/ARNt ortogonal comprende componentes de un solo organismo. En algunas realizaciones, un par de sintetasa/ARNt ortogonal comprende componentes de dos organismos diferentes. En algunas

realizaciones, un par de sintetasa/ARNt ortogonal que comprende componentes que antes de la modificación, promueven la traducción de dos aminoácidos diferentes. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una alanina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una arginina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una asparagina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una sintetasa de ácido aspártico modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una cisteína sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una glutamina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una sintetasa de ácido glutámico modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una alanina glicina modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una histidina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una leucina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una isoleucina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una lisina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una metionina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una fenilalanina

sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una prolina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una serina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una treonina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una sintetasa de triptófano modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una tirosina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una valina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una fosfoserina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de alanina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de arginina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de asparagina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de ácido aspártico modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de cisteína modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de glutamina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de ácido glutámico modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es una alanina glicina modificada. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de histidina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt

ortogonal es un ARNt de leucina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de isoleucina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de lisina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt

5 ortogonal es un ARNt de metionina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de fenilalanina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de prolina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de serina modificado. En algunas

10 realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de treonina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de triptófano modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de tirosina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de valina

15 modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de fosfoserina modificado.

[0111] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora en la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un par aminoacilo (aaRS o RS)-ARNt

20 sintetasa-ARNt. Los ejemplos de pares de aaRS-ARNt incluyen, entre otros, pares de aaRS/ARNt de *Methanococcus jannaschii* (Mj-Tyr), *E. coli* TyrRS (Ec-Tyr)/*B. stearothermophilus*, *E. coli* LeuRS (Ec-Leu)/*B. stearothermophilus* pares de ARNtCUA y pares de pirrolisil-

ARnt. En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un par Mj-TyrRS/ARnt. Los UAA ejemplares que se pueden incorporar mediante un par Mj-TyrRS/ARnt incluyen, pero sin
5 limitación, derivados de fenilalanina para-sustituidos tales como p-aminofenilalanina y p-metofenilalanina; derivados de tirosina meta-sustituidos tales como 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina y 3-yodotirosina; fenilselenocisteína; p-boronofenilalanina; y o-
10 nitrobenciltirosina.

[0112] En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) por un par Ec-Tyr/ARntCUA o un par Ec-Leu/ARntCUA. Los UAA ejemplares que se pueden incorporar mediante un par Ec-
15 Tyr/ARntCUA o un par Ec-Leu/ARntCUA incluyen, pero no se limitan a, derivados de fenilalanina que contienen benzofeno, cetona, yoduro o sustituyentes azida; O-propargiltirosina; ácido α -aminocaprílico, O-metil tirosina, O-nitrobencil
 cisteína; y ácido 3-(naftaleno-2-ilamino)-2-amino-propanóico.

20 [0113] En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un par pirrolisil-ARnt. En algunos casos, el PylRS se obtiene de una arqueobacteria, por ejemplo, de una arqueobacteria metanogénica. En algunos casos, el PylRS se

- obtiene de *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* o *Methanosarcina acetivorans*. Los UAA ejemplares que pueden incorporarse mediante un par de pirrolisil-ARNt incluyen, pero sin limitación, lisinas sustituidas con amida y
- 5** carbamato tales como ácido 2-amino-6-((R)-tetrahydrofurano-2-carboxamido)hexanóico, N-ε-D-prolil-L-lisina y N-ε-ciclopentiloxicarbonil-L-lisina; N-ε-Acriloil-L-lisina; N-ε-[(1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)etoxi)carbonil]-L-lisina; y N-ε-(1-metilciclopro-2-enecarboxamido)lisina.
- 10** [0114] En algunos casos, se incorpora un aminoácido no natural en una citocina descrita en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante una sintetasa descrita en los documentos US 9,988,619 y US 9,938,516. Los UAA ejemplares que pueden incorporarse mediante tales
- 15** sintetisas incluyen para-metilazido-L-fenilalanina, aralquilo, heterociclilo, heteroaralquilo, aminoácidos no naturales y otros. En algunas realizaciones, tales UAA comprenden piridilo, pirazinilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo, tiazolilo, tiofenilo u otro heterociclo. Tales
- 20** aminoácidos en algunas realizaciones comprenden azidas, tetrazinas u otro grupo químico capaz de conjugarse con un compañero de acoplamiento, tal como un residuo soluble en agua. En algunas realizaciones, tales sintetisas se expresan y usan para incorporar UAA en citocinas in vivo. En algunas

realizaciones, tales sintetetasas se usan para incorporar UAA en citocinas usando un sistema de traducción libre de células.

[0115] En algunos casos, un aminoácido no natural se
5 incorpora a una citocina descrita en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido IL) por una sintetasa natural. En algunas realizaciones, un aminoácido no natural se incorpora a una citocina por un organismo que es auxotrófico para uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, las
10 sintetetasas correspondientes al aminoácido auxotrófico son capaces de cargar el correspondiente ARNt con un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es selenocisteína, o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es
15 seleniometionina, o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es un aminoácido aromático, en donde, el aminoácido aromático comprende un haluro de arilo, tal como un yoduro. En realizaciones, el aminoácido no natural es estructuralmente similar al
20 aminoácido auxotrófico.

[0116] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la Figura 1.

[0117] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un derivado o análogo de lisina o fenilalanina. En

algunos casos, el aminoácido no natural comprende un derivado de lisina o un análogo de lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural comprende una pirrolisina (Pyl). En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un derivado de fenilalanina o un análogo de fenilalanina. En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido no natural descrito en Wan, et al., ""Pyrrolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool" [Pirrolisil-ARNt sintetasa: una enzima ordinaria pero una herramienta de expansión de código genético sobresaliente", Biochem Biophys Aceta 1844 (6):1059-4070 (2014). En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la Figura 2 (por ejemplo, la Figura 2A y la Figura 2B).

[0118] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la Figura 3A- Figura 3D (adoptado de la Tabla 1 de Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69).

[0119] En algunas realizaciones, un aminoácido no natural incorporado en una citocina descrita en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido IL) se describe en los documentos US 9,840,493; US 9,682,934; US 2017/0260137; US 9,938,516; o US 2018/0086734. Los UAAs ejemplares que pueden incorporarse mediante tales sintetisas incluyen para-

metilazido-L-fenilalanina, aralquilo, heterociclilo y heteroaralquilo, y aminoácidos no naturales derivados de lisina. En algunas realizaciones, tales UAA comprenden piridilo, pirazinilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo, 5 tiazolilo, tiofenilo u otro heterociclo. Tales aminoácidos en algunas realizaciones comprenden azidas, tetrazinas u otro grupo químico capaz de conjugarse con un compañero de acoplamiento, tal como un residuo soluble en agua. En algunas realizaciones, un UAA comprende una azida unida a un residuo 10 aromático a través de un enlazador de alquilo. En algunas realizaciones, un conector de alquilo es un conector de C₁-C₁₀. En algunas realizaciones, un UAA comprende una tetrazina unida a un residuo aromático a través de un enlazador de alquilo. En algunas realizaciones, un UAA 15 comprende una tetrazina unida a un residuo aromático a través de un grupo amino. En algunas realizaciones, un UAA comprende una tetrazina unida a un residuo aromático a través de un grupo alquilamino. En algunas realizaciones, un UAA comprende una azida unida al nitrógeno terminal (por ejemplo, N6 de un 20 derivado de lisina, o N5, N4 o N3 de un derivado que comprende una cadena lateral de alquilo más corta) de una cadena lateral de aminoácidos a través de una cadena de alquilo. En algunas realizaciones, un UAA comprende una tetrazina unida al nitrógeno terminal de una cadena lateral

de aminoácidos a través de una cadena de alquilo. En algunas realizaciones, un UAA comprende una azida o tetrazina unida a una amida a través de un conector de alquilo. En algunas realizaciones, el UAA es un carbamato o amida que contiene azida o tetrazina de 3-aminoalanina, serina, lisina o derivado de la misma. En algunas realizaciones, tales UAA se incorporan a las citocinas in vivo. En algunas realizaciones, tales UAA se incorporan a las citocinas en un sistema libre de células.

10 Residuos Conjugados

[0120] En ciertas realizaciones, descritas en el presente documento son residuos conjugados que están unidos a una o más citocinas (por ejemplo, interleucinas, IFN o TNF) descritas anteriormente. En algunos casos, el residuo conjugado es una molécula que perturba la interacción de una citocina con su receptor. En algunos casos, el residuo conjugado es cualquier molécula que, cuando se une a la citocina, permite que el conjugado de citocina module una respuesta inmune. En algunos casos, el residuo conjugante comprende un polímero soluble en agua. En otros casos, el residuo conjugante comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma. En casos adicionales, el residuo conjugante comprende un péptido. En casos adicionales, el residuo conjugado comprende un ácido nucleico. En casos

adicionales, el residuo conjugado comprende una molécula pequeña. En algunos casos, el residuo conjugado aumenta la vida media en suero o mejora la estabilidad. En algunos casos, el residuo conjugado reduce la interacción de

5 citoquinas con uno o más dominios o subunidades de receptores de citocinas. En casos adicionales, el residuo conjugado bloquea la interacción de citocinas de uno o más dominios o subunidades de citocinas con su (s) receptor (es) asociado (s). En algunas realizaciones, los conjugados de citoquinas

10 descritos en el presente documento comprenden múltiples residuos conjugados. En algunas realizaciones, un residuo conjugado se une a un aminoácido natural o no natural en el péptido de citocina. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina comprende un residuo conjugado unido a un

15 aminoácido natural. En algunas realizaciones, un conjugado de citocina está unido a un aminoácido no natural en el péptido de citocina. En algunas realizaciones, un residuo conjugante se une al aminoácido terminal N o C del péptido de citocina. En el presente documento se describen diversos sitios de

20 combinaciones, por ejemplo, un primer residuo conjugante está unido a un aminoácido no natural o natural en el péptido de citocina, y un segundo residuo conjugado está unido al aminoácido terminal N o C del péptido de citocina. En algunas realizaciones, un residuo conjugante se une a múltiples

residuos del péptido de citocina (por ejemplo, una grapa). En algunas realizaciones, un residuo conjugante está unido a los aminoácidos terminales N y C del péptido de citocina.

Polímeros Solubles En Agua

- 5** [0121] En algunas realizaciones, un residuo conjugante descrito aquí es un polímero soluble en agua. En algunos casos, el polímero soluble en agua es un péptido no péptido, no tóxico y biocompatible. Como se usa en el presente documento, una sustancia se considera biocompatible si los
- 10** efectos beneficiosos asociados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo, Un agente activo como una fracción de citocina) en relación con los tejidos vivos (por ejemplo, La administración a un paciente) son mayores cualquier efecto nocivo según lo evaluado por un médico, por
- 15** ejemplo, un médico, un toxicólogo o un especialista en desarrollo clínico. En algunos casos, un polímero soluble en agua es además no inmunogénico. En algunos casos, una sustancia se considera no inmunogénica si el uso previsto de la sustancia in vivo no produce una respuesta inmune no
- 20** deseada (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmune, que tal respuesta no es se considera clínicamente significativo o importante según lo evaluado por un médico, por ejemplo, un médico, un toxicólogo o un especialista en desarrollo clínico.

[0122] En algunos casos, el polímero soluble en agua se caracteriza por tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 300 terminales. Ejemplos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol ("PEG"), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmecrilamida), poli(hidroxialquilmecrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliacrilamida (PAAm), poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (PHPMA), polidimetilacrilamida (PDAAm), polifosfenceno, polioxazolinas ("POZ") (que se describen en el documento WO 2008/106186), poli(N-acriloilmorfolina) y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

[0123] En algunos casos, el polímero soluble en agua no está limitado a una estructura particular. En algunos casos, el polímero soluble en agua es lineal (por ejemplo, Un extremo tapado, por ejemplo, Alcoxi PEG o un PEG bifuncional), ramificado o de brazos múltiples (por ejemplo, PEG bifurcado o PEG unido a un núcleo de polioli), dendrítico (o estrella), cada uno con o sin uno o más enlaces degradables. Además, la estructura interna del polímero soluble en agua se puede organizar en cualquier número de

patrones de repetición diferentes y se puede seleccionar del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alterno, copolímero aleatorio, copolímero de bloque, tripolímero alterno, tripolímero aleatorio y tripolímero de bloque.

- 5** [0124] En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del polímero soluble en agua en el conjugado de IL-2 es de aproximadamente 100 Daltons a aproximadamente 150,000 Daltons. Los rangos ejemplares incluyen, por ejemplo, pesos moleculares promedio en peso en el rango de más de
- 10** 5,000 Daltons a aproximadamente 100,000 Daltons, en el rango de aproximadamente 6,000 Daltons a aproximadamente 90,000 Daltons, en el rango de aproximadamente 10,000 Daltons a aproximadamente 85,000 Daltons, en el rango de más de 10,000 Daltons a aproximadamente 85,000 Daltons, en el rango de
- 15** aproximadamente 20,000 Daltons a aproximadamente 85,000 Daltons, en el rango de aproximadamente 53,000 Daltons a aproximadamente 85,000 Daltons, en el rango de aproximadamente 25,000 Daltons a aproximadamente 120,000 Daltons, en el rango de aproximadamente 29,000 Daltons a
- 20** aproximadamente 120,000 Daltons, en el rango de aproximadamente 35,000 Daltons a aproximadamente 120,000 Daltons, y en el rango de aproximadamente 40,000 Daltons a aproximadamente 120,000 Daltons.

[0125] Ejemplos de pesos moleculares promedio en peso

para el polímero soluble en agua incluyen aproximadamente 100 Daltons, aproximadamente 200 Daltons, aproximadamente 300 Daltons, aproximadamente 400 Daltons, aproximadamente 500 Daltons, aproximadamente 600 Daltons, aproximadamente 700 Daltons, aproximadamente 750 Daltons, aproximadamente 800 Daltons, aproximadamente 900 Daltons, aproximadamente 1,000 Daltons, aproximadamente 1,500 Daltons, aproximadamente 2,000 Daltons, aproximadamente 2,200 Daltons, aproximadamente 2,500 Daltons, aproximadamente 3,000 Daltons, aproximadamente 4,000 Daltons, aproximadamente 4,400 Daltons, aproximadamente 4,500 Daltons, aproximadamente 5,000 Daltons, aproximadamente 5,500 Daltons, aproximadamente 6,000 Daltons, aproximadamente 7,000 Daltons, aproximadamente 7,500 Daltons, aproximadamente 8,000 Daltons, aproximadamente 9,000 Daltons, aproximadamente 10,000 Daltons, aproximadamente 11,000 Daltons, aproximadamente 12,000 Daltons, aproximadamente 13,000 Daltons, aproximadamente 14,000 Daltons, aproximadamente 15,000 Daltons, aproximadamente 20,000 Daltons, aproximadamente 22,500 Daltons, aproximadamente 25,000 Daltons, aproximadamente 30,000 Daltons, aproximadamente 35,000 Daltons, aproximadamente 40,000 Daltons, aproximadamente 45,000 Daltons, aproximadamente 50,000 Daltons, aproximadamente 55,000 Daltons, aproximadamente 60,000 Daltons, aproximadamente 65,000 Daltons,

- aproximadamente 70,000 Daltons, y alrededor de 75,000 Daltons. También se pueden usar versiones ramificadas del polímero soluble en agua (por ejemplo, un polímero soluble en agua ramificado de 40,000 Dalton compuesto por dos polímeros
- 5** de 20,000 Dalton) que tiene un peso molecular total de cualquiera de los anteriores. En una o más realizaciones, el conjugado no tendrá residuos de PEG unidos, ni directa ni indirectamente, con un PEG que tiene un peso molecular promedio en peso de menos de aproximadamente 6,000 Daltons.
- 10** [0126] Los PEG comprenderán típicamente una cantidad de monómeros (OCH_2CH_2) [o monómeros ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), dependiendo de cómo se defina el PEG]. Como se usa en este documento, el número de unidades repetitivas se identifica mediante el subíndice "n" en " $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ". Por lo tanto, el valor de (n)
- 15** generalmente se encuentra dentro de uno o más de los siguientes rangos: de 2 a aproximadamente 3400, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2300, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2270, de aproximadamente 136 a aproximadamente 2050, de
- 20** aproximadamente 225 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 450 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 1200 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 568 a aproximadamente 2727, de aproximadamente 660 a aproximadamente 2730, de

aproximadamente 795 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 909 a aproximadamente 2730, y de aproximadamente 1,200 a aproximadamente 1,900. Para cualquier

5 polímero dado en donde, se conoce el peso molecular, es posible determinar el número de unidades repetitivas (es decir, "n") dividiendo el peso molecular promedio en peso total del polímero por el peso molecular del monómero repetitivo.

10 [0127] En algunos casos, el polímero soluble en agua es un polímero con tapa terminal, es decir, un polímero que tiene al menos un terminal cubierto con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C_1-C_6 inferior, o un grupo hidroxilo. Cuando el polímero es PEG, por ejemplo,

15 se puede usar un metoxi-PEG (comúnmente conocido como mPEG), que es una forma lineal de PEG en la que un extremo del polímero es un grupo metoxi ($-OCH_3$), mientras que el otro extremo es un hidroxilo u otro grupo funcional que puede modificarse opcionalmente químicamente.

20 [0128] En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua ejemplares incluyen, pero sin limitación, PEG discreto lineal o ramificado (dPEG) de Quanta Biodesign, Ltd; PEG lineales, ramificados o bifurcados de Nektar Therapeutics; y derivados de PEG en forma de Y de JenKem

Technology.

[0129] En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con un polímero soluble en agua seleccionado de poli(alquilenglicoles) tal como polietilenglicol ("PEG"), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos)), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(acrilamida (PAAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (PHPMA), polifosfenceno, polioxazolinas ("POZ"), Poli(N-acriloilmorfolina) y una combinación de los mismos. En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con PEG (por ejemplo, PEGilado). En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con PPG. En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con POZ. En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con PVP.

[0130] En algunas realizaciones, un polipéptido IL-2 descrito en el presente documento se conjuga con un polímero soluble en agua seleccionado de poli(alquilenglicoles) tal como polietilenglicol ("PEG"), poli(propilenglicol) ("PPG"),

copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmecrilamida), poli(hidroxialquilmecrilato), poli(sacáridos), poli(α -
5 hidroxiaácido), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliacrilamida (PAAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (PHPMA), polifosfenceno, polioxazolinas ("POZ"), poli(N-acriloilmorfolina), y una combinación de los mismos. En algunos casos, el polipéptido
10 IL-2 se conjuga con PEG (por ejemplo, PEGilado). En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con PPG. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con POZ. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con PVP.

[0131] En algunos casos, un polímero soluble en agua
15 comprende un poliglicerol (PG). En algunos casos, el poliglicerol es un PG hiperramificado (HPG) (por ejemplo, según lo descrito por Imran, et al. "Influencia de la arquitectura de los poligliceroles lineales y ramificados de alto peso molecular en su biocompatibilidad y
20 biodistribución", Biomaterials 33: 9135-9147 (2012)). En otros casos, el poliglicerol es un PG lineal (LPG). En casos adicionales, el poliglicerol es un PG medio funcional, un PG hiperbloqueado de bloque lineal (por ejemplo, Según lo descrito por Wurm et. Al., "Squaric acid mediated synthesis

and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly(glicerol)-protein conjugates" [Síntesis mediada por el ácido escuárico y actividad biológica de una biblioteca de conjugados de proteínas de poli(glicerol) lineales e hiperramificadas], *Biomacromolecules* 13:1161-1171 (2012)), o un PG funcional de cadena lateral (por ejemplo, como se describe en) Li, et. al., "Synthesis of linear polyéter polyol derivatives as new materials for bioconjugation" [Síntesis de derivados lineales de poliol poliéter como nuevos materiales para bioconjugación], *Bioconjugate Chem.* 20:780-789 (2009).

[0132] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con un PG, por ejemplo, un HPG, un LPG, un PG de funcionamiento medio, un PG hiperbloqueado de bloque lineal, o un PG funcional de cadena lateral. En algunos casos, la citocina es un polipéptido IL-2. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un PG, un PG de funcionamiento medio, un PG hiperbloqueado de bloque lineal.

[0133] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua es una alternativa de PEG sintético degradable. Ejemplos de alternativas de PEG sintético degradable incluyen, pero no se limitan a, poli[oligo(etilenglicol)metilmetacrilato] (POEGMA); derivados de PEG modificados con estructura

generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequélícos o di-funcionales; Derivados de PEG que comprenden comonómeros que comprenden enlaces degradables tales como poli [(etilen óxido)-co-(óxido de etileno y metileno)] [P(EO-co-MEO)], acetales de queteno cíclicos tales como 5,6-benzo-2-metileno- 1,3-dioxepano (BMDO), 2-metileno-1,3-dioxepano (MDO) y 2-metileno-4-fenil-1,3-dioxolano (MPDL) copolimerizados con OEGMA; o poli(ϵ -caprolactona)-injerto-poli(óxido de etileno) (PCL-g-PEO).

- 10** [0134] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con una alternativa de PEG sintético degradable, como, por ejemplo, POEGM; derivados de PEG modificados con estructura generados por polimerización de
- 15** macromonómeros basados en PEG telequélícos o di-funcionales; P(EO-co-MEO); acetales de queteno cíclicos tales como BMDO, MDO y MPDL copolimerizados con OEGMA; o PCL-g-PEO. En algunos casos, la citocina es un polipéptido IL-2. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con una alternativa PEG
- 20** sintética degradable, como, por ejemplo, POEGM; derivados de PEG modificados con estructura generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequélícos o di-funcionales; P(EO-co-MEO); acetales de queteno cíclicos tales como BMDO, MDO y MPDL copolimerizados con OEGMA; o PCL-g-PEO.

[0135] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua comprende un poli(iones híbridos). Los ejemplos de poli(zwitteriones) incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de sulfobetaina) (PSBMA), poli(metacrilato de carboxibetaina) (PCBMA) y poli(2-metilacrilatoiloxietilfosforilcolina) (PMPC). En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con un poli(zwitterion) como PSBMA, PCBMA o PMPC. En algunos casos, la citocina es un polipéptido IL-2. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un poli(zwitterion) como PSBMA, PCBMA o PMPC.

[0136] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua comprende un policarbonato. Los ejemplos de policarbonos incluyen, pero no se limitan a, 5-metil-2-oxo-1,3-dioxano-5-carboxilato de pentafluorofenilo (MTC-OC₆F₅). En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con un policarbonato tal como MTC-OC₆F₅. En algunos casos, la citocina es un polipéptido IL-2. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un policarbonato tal como MTC-OC₆F₅.

[0137] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua comprende un híbrido polimérico, tal como, por ejemplo,

un híbrido policarbonato/polímero PEG, un conjugado péptido/proteína-polímero, o un polímero derivatizado que contiene hidroxilo o ion híbrido (por ejemplo, un que contiene hidroxilo o polímero PEG derivatizado con ion

5 híbrido). En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con un híbrido polimérico tal como un híbrido policarbonato/polímero PEG, un conjugado péptido/proteína-polímero, o un hidroxilo que contiene o

10 zwitteriónico polímero derivatizado (por ejemplo, un polímero PEG derivatizado que contiene hidroxilo o zwitteriónico). En algunos casos, la citocina es un polipéptido IL-2. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un híbrido polimérico tal como un híbrido policarbonato/polímero PEG, un

15 conjugado péptido/proteína-polímero, o un polímero derivado hidroxilo o zwitteriónico (por ejemplo, Un hidroxilo o zwitteriónico polímero PEG derivatizado).

[0138] En algunos casos, un polímero soluble en agua comprende un polisacárido. Los polisacáridos ejemplares

20 incluyen, pero sin limitación, dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o hidroxietilalmidón (HES). En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un polisacárido. En

algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con dextrano. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con PSA. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con HA. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con amilosa. En
5 algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con heparina. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con HS. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con dextrina. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con HES.

[0139] En algunos casos, un polímero soluble en agua
10 comprende un glicano. Las clases ejemplares de glucanos incluyen glucanos unidos a N, glucanos unidos a O, glucolípidos, O-GlcNAc y glucosaminoglucanos. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un glicano. En
15 algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con glucanos N-unidos. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con glucanos unidos a O. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con glucolípidos. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con O-GlcNAc. En algunos casos, un
20 polipéptido IL-2 se conjuga con glicosaminoglucanos.

[0140] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua comprende un polímero de polioxazolina. Un polímero de polioxazolina es un polímero sintético lineal, y similar al PEG, comprende una baja polidispersidad. En algunos casos, un

polímero de polioxazolina es un polímero de polioxazolina polidisperso, caracterizado con un peso molecular promedio. En algunos casos, el peso molecular promedio de un polímero de polioxazolina incluye, por ejemplo, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 100,000, 200,000, 300,000, 400,000, o 500,000 Da. En algunos casos, un polímero de polioxazolina comprende poli(2-metil 2-oxazolina) (PMOZ), poli(2-etil 2-oxazolina) (PEOZ) o poli(2-propil 2-oxazolina) (PPOZ). En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un polímero de polioxazolina. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un polímero de polioxazolina. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con PMOZ. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con PEOZ. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con PPOZ.

[0141] En algunos casos, un polímero soluble en agua comprende un polímero de ácido poliacrílico. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un polímero de ácido poliacrílico. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un polímero de ácido poliacrílico.

[0142] En algunos casos, un polímero soluble en agua

comprende poliamina. La poliamina es un polímero orgánico que comprende dos o más grupos amino primarios. En algunas realizaciones, una poliamina incluye una poliamina ramificada, una poliamina lineal o una poliamina cíclica. En
5 algunos casos, una poliamina es una poliamina lineal de bajo peso molecular. Las poliaminas ejemplares incluyen putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, etilendiamina, 1,3-diaminopropano, hexametilendiamina, tetraetilmetilendiamina y piperazina. En algunos casos, un
10 polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con una poliamina. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con poliamina. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, etilendiamina, 1,3-diaminopropano,
15 hexametilendiamina, tetraetilmetilendiamina o piperazina.

[0143] En algunos casos, un polímero soluble en agua se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7,744,861, 8,273,833, y 7,803,777. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o
20 TNF) se conjuga con un conector descrito en la Patente de Estados Unidos Nos. 7,744,861, 8,273,833, o 7,803,777. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un conector descrito en la Patente de Estados Unidos Nos. 7,744,861, 8,273,833, o 7,803,777.

Proteínas

[0144] En algunas realizaciones, un residuo conjugante descrito aquí es una proteína o un fragmento de unión de la misma. Las proteínas ejemplares incluyen albúmina, transferrina o transtiretina. En algunos casos, la proteína o un fragmento de unión del mismo comprende un anticuerpo, o sus fragmentos de unión del mismo. En algunos casos, un conjugado de citocina comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma. En algunos casos, un conjugado de IL-2 que comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma tiene una vida media o estabilidad en suero incrementada. En algunos casos, un conjugado de IL-2 que comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma tiene una interacción reducida de IL-2 con una o más subunidades de IL-2R. En casos adicionales, la proteína o un fragmento de unión de la misma bloquea la interacción de IL-2 con una o más subunidades de IL-2R, o afecta el ensamblaje del complejo de señalización de IL-2R $\beta\gamma$.

[0145] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es albúmina. La albúmina es una familia de proteínas globulares solubles en agua. Se encuentra comúnmente en el plasma sanguíneo, y comprende aproximadamente el 55-60% de todas las proteínas plasmáticas. La albúmina sérica humana (HSA) es un polipéptido de 585 aminoácidos en donde, la estructura

terciaria se divide en tres dominios, dominio I (residuos de aminoácidos 1-195), dominio II (residuos de aminoácidos 196-383) y dominio III (amino residuos ácidos 384-585). Cada dominio comprende además un sitio de unión, que puede interactuar de manera reversible o irreversible con ligandos endógenos tales como ácidos grasos de cadena larga y media, bilirrubina o hemina, o compuestos exógenos tales como compuestos heterocíclicos o aromáticos.

[0146] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con albúmina. En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con la albúmina sérica humana (HSA). En casos adicionales, el polipéptido de citocina se conjuga con un fragmento funcional de albúmina.

[0147] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con albúmina. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con albúmina de suero humano (HSA). En casos adicionales, el polipéptido IL-2 se conjuga con un fragmento funcional de albúmina.

[0148] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es transferrina. La transferrina es un polipéptido de 679 aminoácidos que tiene un tamaño de aproximadamente 80 kDa y comprende dos sitios de unión a Fe^{3+} con uno en el dominio N-terminal y el otro en el dominio C-terminal. En algunos

casos, la transferrina humana tiene una vida media de aproximadamente 7-12 días.

[0149] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con
5 transferrina. En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con la transferrina humana. En casos adicionales, el polipéptido de citocina se conjuga con un fragmento funcional de transferrina.

[0150] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga
10 con transferrina. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con transferrina humana. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 se conjuga con un fragmento funcional de transferrina.

[0151] En algunas realizaciones, el residuo conjugado
15 es transtiretina (TTR). La transtiretina es una proteína de transporte ubicada en el suero y el líquido cefalorraquídeo que transporta la hormona tiroidea tiroxina (T_4) y la proteína de unión al retinol unida al retinol.

[0152] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por
20 ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con transtiretina (a través de uno de sus terminales a través de una región de bisagra interna). En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con un fragmento funcional de transtiretina.

[0153] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con transtiretina (a través de uno de sus terminales o mediante una región de bisagra interna). En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un fragmento funcional de transtiretina.

[0154] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es un anticuerpo, o sus fragmentos de unión. En algunos casos, un anticuerpo o sus fragmentos de unión comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)'₃ fragmentos, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis- scFv, (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo, proteína Fv e estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo.

[0155] En algunos casos, el residuo conjugado comprende un scFv, bis- scFv, (scFv)₂, dsFv o sdAb. En algunos casos, el residuo conjugado comprende un scFv. En algunos casos, el

residuo conjugado comprende un bis- scFv. En algunos casos, el residuo conjugado comprende un (scFv)₂. En algunos casos, el residuo conjugado comprende un dsFv. En algunos casos, el residuo conjugado comprende un sdAb.

5 [0156] En algunos casos, el residuo conjugante comprende una porción Fc de un anticuerpo, por ejemplo, de IgG, IgA, IgM, IgE o IgD. En algunos casos, el residuo comprende una porción Fc de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₃ o IgG₄).

10 [0157] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un anticuerpo, o sus fragmentos de unión. En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino

15 o fragmento de unión del mismo, anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)'₃ fragmentos, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis- scFv,

20 (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo, proteína Fv e estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del

mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo. En casos adicionales, el polipéptido de citocina se conjuga con una porción Fc de un anticuerpo. En casos adicionales, el polipéptido de citocina se conjuga con una porción Fc de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₃ o IgG₄).

[0158] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un anticuerpo, o sus fragmentos de unión. En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)'₃ fragmentos, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis- scFv, (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo, proteína Fv e estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 se conjuga con una porción Fc de un anticuerpo. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 se conjuga con una porción Fc de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₃ o IgG₄).

[0159] En algunas realizaciones, un polipéptido IL-2 se conjuga con un polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG) y un anticuerpo o fragmento de unión del mismo. En algunos casos, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo

5 comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)'₃ fragmentos,

10 fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis- scFv, (scFv)₂, diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, humacuerpo, proteína Fv e estabilizada con disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, anticuerpo de camélido o fragmento de unión

15 del mismo, anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo. En algunos casos, el anticuerpo o sus fragmentos de unión comprenden un scFv, bis- scFv, (scFv)₂, dsFv o sdAb. En algunos casos, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo

20 comprenden un scFv. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo guía el conjugado de IL-2 a una célula objetivo de interés y el polímero soluble en agua mejora la estabilidad o la semivida en suero.

[0160] En algunos casos, uno o más conjugados de

polipéptido IL-2- polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG) se unen además a un anticuerpo o fragmentos de unión del mismo. En algunos casos, la relación del conjugado de IL-2 con el anticuerpo es aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 5 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1 o 12:1. En algunos casos, la relación del conjugado IL-2 con el anticuerpo es de aproximadamente 1:1. En otros casos, la relación del conjugado de IL-2 con el anticuerpo es aproximadamente 2:1, 3:1 o 4:1. En casos adicionales, la proporción del conjugado 10 de IL-2 al anticuerpo es de aproximadamente 6:1 o superior.

[0161] En algunas realizaciones, el uno o más polipéptidos IL-2- conjugados de polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG) están directamente unidos al anticuerpo o 15 fragmentos de unión del mismo. En otros casos, el conjugado de IL-2 se une indirectamente al anticuerpo o fragmentos de unión del mismo con un conector. Los enlazadores ejemplares incluyen enlazadores homobifuncionales, enlazadores heterobifuncionales, enlazadores basados en maleimida, 20 enlazadores de traza cero, enlazadores autoinmolativos, espaciadores y similares.

[0162] En algunas realizaciones, el anticuerpo o los fragmentos de unión del mismo se unen directa o indirectamente a la porción de polipéptido IL-2 del

polipéptido IL-2- conjugado de polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG). En tales casos, el sitio de conjugación del anticuerpo con el polipéptido IL-2 está en un sitio que no impedirá la unión del polipéptido IL-2 con el IL-2R $\beta\gamma$. En

5 casos adicionales, el sitio de conjugación del anticuerpo con el polipéptido IL-2 está en un sitio que bloquea parcialmente la unión del polipéptido IL-2 con el IL-2R $\beta\gamma$. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo se unen directa o indirectamente a la porción de polímero

10 soluble en agua del polipéptido IL-2- conjugado de polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG).

Péptidos

[0163] En algunas realizaciones, un residuo conjugante descrito aquí es un péptido. En algunos casos, el péptido es

15 un péptido no estructurado. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un péptido. En algunos casos, el conjugado de IL-2 que comprende un péptido tiene una vida media o estabilidad en suero incrementada. En algunos casos, el conjugado de IL-2

20 que comprende un péptido tiene una interacción reducida de IL-2 con una o más subunidades de IL-2R. En casos adicionales, el péptido bloquea la interacción de IL-2 con una o más subunidades de IL-2R.

[0164] En algunos casos, el residuo conjugado es un

péptido XTEN™ (Amunix Operating Inc.) y la modificación se denomina XTENilación. XTENilación es la fusión genética de un ácido nucléico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucléico que codifica un péptido XTEN™ (Amunix Operating Inc.), un péptido hidrofílico no estructurado que comprende un porcentaje diferente de seis aminoácidos: Ala, Glu, Gly, Ser y Thr. En algunos casos, se selecciona un péptido XTEN™ en función de propiedades tales como expresión, estabilidad genética, solubilidad, resistencia a la agregación, vida media mejorada, mayor potencia o mayor actividad in vitro en combinación con un polipéptido de interés. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un péptido XTEN. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un péptido XTEN.

[0165] En algunos casos, el residuo conjugante es un polímero de homoaminoácido rico en glicina (HAP) y la modificación se denomina HAPilación. La HAPilación es la fusión genética de un ácido nucléico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucléico que codifica un polímero de homoaminoácido (HAP) rico en glicina. En algunos casos, el polímero HAP comprende un motivo de repetición (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 3) y algunas veces tiene aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300 o más residuos de

longitud. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con HAP. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con HAP.

[0166] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es un polipéptido PAS y la modificación se denomina PASilación. La PASilación es la fusión genética de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucleico que codifica un polipéptido PAS. Un polipéptido PAS es un polipéptido hidrofílico sin carga que consiste en residuos Pro, Ala y Ser. En algunos casos, la longitud de un polipéptido PAS es de al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500 o 600 aminoácidos. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un polipéptido PAS. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un polipéptido PAS.

[0167] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es un polipéptido similar a elastina (ELP) y la modificación se denomina ELPilación. ELPilación es la fusión genética de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a la elastina (ELP). Un ELP comprende un motivo de repetición VPGxG (SEQ ID NO: 4) en donde, x es cualquier aminoácido excepto prolina. En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con

ELP. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con ELP.

[0168] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es un péptido CTP. Un péptido CTP comprende un péptido con
 5 residuo de 31 aminoácidos FQSSSS * KAPPPS * LPSPS * RLPGPS * DTPILPQ (SEQ ID NO: 5) en donde, S * indica sitios de O-glicosilación (OPKO). En algunos casos, un péptido CTP se fusiona genéticamente con un polipéptido de citocina (por ejemplo, un polipéptido IL-2). En algunos casos, un
 10 polipéptido de citocina (por ejemplo, un polipéptido IL-2) se conjuga con un péptido CTP.

[0169] En algunas realizaciones, una citocina (por ejemplo, un polipéptido IL-2) se modifica por glutamilación. La glutamilación (o poliglutamilación) es una modificación
 15 reversible postraducciona del glutamato, en la que el grupo γ -carboxi del glutamato forma un enlace similar a un péptido con el grupo amino de un glutamato libre en donde, el grupo α -carboxi se extiende en una cadena de poliglutamato.

[0170] En algunas realizaciones, una citocina (por
 20 ejemplo, un polipéptido IL-2) es modificada por un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunos casos, el polímero GLK comprende múltiples repeticiones de Gly-Xaa-Yaa en donde Xaa y Yaa comprenden principalmente prolina y 4-hidroxiprolina, respectivamente. En algunos casos, el

polímero GLK comprende además residuos de aminoácidos Pro, Gly, Glu, Qln, Asn, Ser y Lys. En algunos casos, la longitud del polímero GLK es de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150 residuos o más.

5 Residuos Conjugativos Adicionales

[0171] En algunos casos, el residuo conjugado comprende un biomarcador extracelular. En algunos casos, el biomarcador extracelular es un antígeno tumoral. En algunos casos, el biomarcador extracelular ejemplar comprende CD19, PSMA, B7-
10 H3, B7-H6, CD70, CEA, CSPG4, EGFRvIII, EphA3, EpCAM, EGFR, ErbB2 (HER2), FAP, FR α , GD2, GD3, Lewis-Y, mesotelina, Mucl, Muc 16, ROR1, TAG72, VEGFR2, CD11, Gr-1, CD204, CD16, CD49b, CD3, CD4, CD8 y B220. En algunos casos, el residuo conjugado está unido o conjugado a la citocina (por ejemplo, IL-2). En
15 algunos casos, el residuo conjugado se fusiona genéticamente, por ejemplo, en la N-terminal o la C-terminal de la citocina (por ejemplo, IL-2).

[0172] En algunos casos, el residuo conjugante comprende una molécula de una modificación postraducciona. En algunos
20 casos, los ejemplos de modificación postraducciona incluyen miristoilación, palmitoilación, isoprenilación (o prenilación) (por ejemplo, Farnesilación o geranilgeranilación), glipiación, acilación (por ejemplo, O-acilación, N-acilación, S-acilación), alquilación (por

- ejemplo, adicional de grupos alquilo tales como grupos metilo o etilo), amidación, glicosilación, hidroxilación, yodación, adición de nucleótidos, oxidación, fosforilación, succinilación, sulfatación, glicación, carbamilación, glutamilación o desamidación. En algunos casos, la citocina (por ejemplo, IL-2) se modifica mediante una modificación postraducciona
- 5 como miristoilación, palmitoilación, isoprenilación (o prenilación) (por ejemplo, Farnesilación o geranilgeranilación), glipiación, acilación (por ejemplo, O-acilación, N-acilación, S-acilación), alquilación (por
- 10 ejemplo, adicional de grupos alquilo tales como grupos metilo o etilo), amidación, glicosilación, hidroxilación, yodación, adición de nucleótidos, oxidación, fosforilación, succinilación, sulfatación, glicación, carbamilación, glutamilación, o desamidación.
- 15

Conjugación

Enlazadores

- [0173] En algunas realizaciones, los grupos reactivos funcionales útiles para conjugar o unir un residuo de conjugación a un polipéptido de citocina (por ejemplo, un
- 20 polipéptido IL-2) descrito en el presente documento incluyen, por ejemplo, conectores de orden cero o superior. En algunos casos, un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en el presente documento comprende un

grupo reactivo funcional. En algunos casos, un conector comprende un grupo reactivo funcional que reacciona con un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en este documento. En algunos casos, un residuo

5 conjugado comprende un grupo reactivo funcional que reacciona con un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en este documento. En algunos casos, un residuo conjugado comprende un grupo reactivo funcional que reacciona con un conector (opcionalmente pre-unido a un péptido de

10 citocina) descrito en este documento. En algunas realizaciones, un conector comprende un grupo reactivo que reacciona con un aminoácido natural en un péptido de citocina descrito aquí. En algunos casos, los enlazadores de orden superior comprenden enlazadores bifuncionales, tales como

15 enlazadores homobifuncionales o enlazadores heterobifuncionales. Los enlazadores homobifuncionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, reactivo de Lomant ditiobis(propionato de succinimidilo) DSP, 3'3'-ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP), suberato

20 de disuccinimidilo (DSS), bis(sulfosuccinimidilo)suberato (BS), disuccinimidilo tartrato (DST), disulfosuccinimidilo tartrato (sulfo DST), etileno glicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), disuccinimidilo glutarato (DSG), N,N'-disuccinimidilo carbonato (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil

pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-dithiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidoheptano (BMH), compuesto que contiene aril halido (DFDNB), como, por
 5 ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno or 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis- $[\beta$ -(4-azidosalicilamido)etil]disulfido (BASED), formaldehido, glutaraldehido, 1,4-butanodiol diglicidil éter, ácido adípico dihidrazida, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-
 10 dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenil, ácido sulfónico diyodo-p-xileno, N,N'-etileno-bis(yodoacetamida), o N,N'-hexametileno-bis(yodoacetamida).

[0174] En algunas realizaciones, el conector bifuncional comprende un conector heterobifuncional. Los enlazadores
 15 heterobifuncionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, reticuladores reactivos con aminas y sulfhidrilo tales como N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato (sPDP), N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-sPDP), N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato
 20 (sulfo-LC-sPDP) de cadena larga soluble en agua, succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidil-6- $[\alpha$ -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato

- (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MB), N-succinimidilo (4-yodozoateilo) (sIAB), sulfosuccinimidilo (4-yodoacteil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), N-(γ -maleimidobutiriloxi) s éster de uccinimida (GMBs), éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi) sulfosuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidilo 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidilo 6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidilo 4-(((yodoacetil)amino)metil) ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidilo 6-(((4-yodoacetil)amino)metil) ciclohexano-1-carbonil)amino)hexanoato (sIACX), yodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA), reticuladores reactivos con carbonilo y reactivos con sulfhidrilo como hidrazida de ácido butírico 4-(4-N-maleimidofenil) (MPBH), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M2C2H), 3-(2-piridilditio)propionilhidrazida (PDPH), reticuladores reactivos con aminas y fotorreactivos tales como ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHs-AsA),

N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidosalicílico (sulfo-NHs-AsA),
 sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-
 LC-AsA), sulfosuccinimidil-2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-
 ditiopropato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azido benzoato
5 (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-
 HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-
 nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-
 azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-
 azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOs),
10 sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-
 ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-
 ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidilo (4-azidofenil)-
 1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidilo 4-(p-
 azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidilo 2-(7-
15 azido-4-metilcumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato
 (sAED), sulfosuccinimidilo 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato
 (sulfo-sAMCA), diazopiruvato de p-nitrofenilo (pNPDP), p-
 nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP),
 reticuladores reactivos de sulfhidrilo y fotorreactivos como
20 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-
 (p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida
 (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, benzofenona-4-maleimida
 carbonil-reactivo y reticuladores fotorreactivos como p-
 azidobenzoil-hidrazida (ABH), carboxilato-reactivo y

fotorreactivo reticuladores como 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (AsBA), y reticuladores fotorreactivos y reactivos con arginina tales como p-azidofenil glioxal (APG).

- 5** [0175] En algunos casos, el grupo funcional reactivo comprende un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en un residuo de unión (por ejemplo, en un residuo conjugado o en IL-2). Los ejemplos de grupos electrofílicos incluyen grupos carbonilo, tales como
- 10** aldehído, cetona, ácido carboxílico, éster, amida, enona, haluro de acilo o anhídrido de ácido. En algunas realizaciones, el grupo funcional reactivo es aldehído. Los ejemplos de grupos nucleofílicos incluyen hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina
- 15** y arilhidrazida.

- [0176] En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible. En algunas realizaciones, el enlazador escindible es un enlazador dipéptido. En algunas realizaciones, el conector dipéptido es valina-citrulina
- 20** (Val-Cit), fenilalanina-lisina (Phe-Lys), valina-alanina (Val-Ala) y valina-lisina (Val-Lys). En algunas realizaciones, el conector de dipéptido es valina-citrulina.

[0177] En algunas realizaciones, el conector es un conector peptídico que comprende, por ejemplo, al menos 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos. En algunos casos, el conector peptídico comprende como máximo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o menos aminoácidos. En casos
5 adicionales, el conector peptídico comprende aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos.

[0178] En algunas realizaciones, el enlazador comprende un residuo enlazador autoinmolativo. En algunas
10 realizaciones, el residuo conector autoinmolativo comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobenzioxicarbonilo (PABC), o derivados o análogos de los mismos. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un residuo enlazador dipéptido y un residuo enlazador autoinmolativo. En algunas
15 realizaciones, el residuo enlazador autoinmolativo es tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 9089614 y la Solicitud de la OMPI No. WO2015038426.

[0179] En algunas realizaciones, el enlazador escindible es glucurónido. En algunas realizaciones, el enlazador
20 escindible es un enlazador escindible con ácido. En algunas realizaciones, el enlazador escindible con ácido es hidrazina. En algunas realizaciones, el enlazador escindible es un enlazador reducible.

[0180] En algunas realizaciones, el conector comprende

un grupo maleimida. En algunos casos, el grupo maleimida también se conoce como espaciador de maleimida. En algunos casos, el grupo maleimida comprende además un ácido caproico, que forma maleimidocaproilo (mc). En algunos casos, el

5 conector comprende maleimidocaproilo (mc). En algunos casos, el enlazador es maleimidocaproilo (mc). En otros casos, el grupo maleimida comprende un grupo maleimidometilo, tal como succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sMCC) o sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-

10 1-carboxilato (sulfo-sMCC) descrito arriba.

[0181] En algunas realizaciones, el grupo maleimida es una maleimida autoestabilizante. En algunos casos, la maleimida autoestabilizante utiliza ácido diaminopropiónico (DPR) para incorporar un grupo amino básico adyacente a la

15 maleimida para proporcionar catálisis intramolecular de la hidrólisis del anillo de tiosuccinimida, eliminando así que la maleimida sufra una reacción de deleción a través de una reacción retro-Michael. En algunos casos, la maleimida autoestabilizante es un grupo de maleimida descrito en Lyon,

20 et al., "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," [Las maleimidas autohidrolizantes mejoran la estabilidad y las propiedades farmacológicas de los conjugados de anticuerpo-fármaco], Nat. Biotecnología 32 (10):1059-1062

(2014). En algunos casos, el conector comprende una maleimida autoestabilizante. En algunos casos, el conector es una maleimida autoestabilizante.

Conjugación Química

- 5** [0182] Se usan diversas reacciones de conjugación para conjugar conectores, residuos de conjugación y aminoácidos no naturales incorporados en los péptidos de citocina descritos en este documento. Tales reacciones de conjugación a menudo son compatibles con condiciones acuosas, tales como
- 10** reacciones "bioortogonales". En algunas realizaciones, las reacciones de conjugación están mediadas por reactivos químicos tales como catalizadores, grupos químicos reactivos o ligeros que se encuentran en conectores, residuos de conjugación o aminoácidos no naturales. En algunas
- 15** realizaciones, las reacciones de conjugación están mediadas por enzimas. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación usada en este documento se describe en Gong, Y., Pan, L. Tett. Letón. 2015, 56, 2123. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación usada en este
- 20** documento se describe en Chen, X.; Wu Y-W. Org. Biomol. Chem 2016, 14, 5417.

[0183] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación comprende la reacción de una cetona o aldehído con un nucleófilo. En algunas

realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de una cetona con un grupo aminoxi para formar una oxima. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de una cetona con un grupo aril o heteroarilamina para formar una imina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de un aldehído con un grupo aril o heteroarilamina para formar una imina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un péptido de citocina que comprende un enlazador o residuo de conjugación unido a través de una oxima. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una reacción de Pictet-Spengler de un aldehído o cetona con un nucleófilo de triptamina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una reacción de hidrazino-Pictet-Spengler. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una ligadura Pictet-Spengler.

[0184] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida y una fosfina (unión de Staudinger). En algunas realizaciones, la fosfina es una arilfosfina. En algunas realizaciones, la arilfosfina comprende un grupo orto éster. En algunas realizaciones, la fosfina comprende la estructura 2-

(difenilfosfanil) benzoato de metilo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un péptido de citocina que comprende un conector o residuo de conjugación unido a través de una arilamida. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un péptido de citocina que comprende un enlazador o residuo de conjugación unido a través de una amida.

- 10** [0185] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. En algunas realizaciones, la reacción de cicloadición 1,3-dipolar comprende la reacción de una azida y una fosfina (reacción de "click"). En algunas realizaciones, la reacción de conjugación es catalizada por cobre. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un péptido de citocina que comprende un enlazador o residuo de conjugación unido a través de un triazol. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida con una olefina filtrada. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de

- una azida con un alquino tensado. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida con un cicloalquino, por ejemplo, OCT, DIFO, DIFBO, DIBO, BARAC, TMTH u otro
- 5** cicloalquino tensado, cuyas estructuras se muestran en Gong, Y., Pan, L. Tett. Letón. 2015, 56, 2123. En algunas realizaciones, una reacción de cicloadición 1,3-dipolar es catalizada por la luz ("fotoclick"). En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el
- 10** presente documento comprende la reacción de un grupo alilo terminal con un tetrazol y una luz. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un grupo alquinilo terminal con un tetrazol y una luz. En algunas realizaciones, una reacción de
- 15** conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un aminoácido O-alilo con una tetrazina y luz. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de O-alil tirosina con una tetrazina y luz.
- 20** [0186] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de cicloadición de demanda inversa de electrones que comprende un dieno y un dienófilo. En algunas realizaciones, el dieno comprende una

- tetrazina. En algunas realizaciones, el dienófilo comprende un alqueno. En algunas realizaciones, el dienófilo comprende un alquino. En algunas realizaciones, el alquino es un alquino colado. En algunas realizaciones, el alqueno es un
- 5** dieno colado. En algunas realizaciones, el alquino es un transciclooctino. En algunas realizaciones, el alquino es un cicloocteno. En algunas realizaciones, el alqueno es un ciclopropeno. En algunas realizaciones, el alqueno es un fluorociclopropeno. En algunas realizaciones, una reacción de
- 10** conjugación descrita en el presente documento da como resultado la formación de un péptido de citocina unido a un conector o residuo de conjugación a través de un heterociclo de anillo de 6 miembros que comprende dos átomos de nitrógeno en el anillo.
- 15** [0187] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de metátesis de olefina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la
- 20** reacción de un alqueno y un alquino con un catalizador de rutenio. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en este documento comprende la reacción de dos alquenos con un catalizador de rutenio. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el

presente documento comprende la reacción de dos alquinos con un catalizador de rutenio. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un alqueno o alquino con un catalizador de rutenio y un aminoácido que comprende un grupo alilo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un alqueno o alquino con un catalizador de rutenio y un aminoácido que comprende un sulfuro o seleniuro de alilo. En algunas realizaciones, un catalizador de rutenio es el catalizador Hoveda-Grubbs de segunda generación. En algunas realizaciones, una reacción de metátesis de olefina comprende la reacción de uno o más alquenos o alquinos colados.

[0188] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de acoplamiento cruzado. En algunas realizaciones, las reacciones de acoplamiento cruzado comprenden catalizadores de metales de transición, tales como iridio, oro, rutenio, rodio, paladio, níquel, platino u otro catalizador de metales de transición y uno o más ligandos. En algunas realizaciones, los catalizadores de metales de transición son solubles en agua. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento

comprende una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un haluro de arilo (o triflato o tosilato), un ácido aril o alquenil borónico y un catalizador de paladio. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de acoplamiento cruzado de Sonogashira. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un haluro de arilo (o triflato o tosilato), un alquino y un catalizador de paladio. En algunas realizaciones, las reacciones de acoplamiento cruzado dan como resultado la unión de un enlazador o residuo conjugado a un péptido de citocina a través de un enlace carbono-carbono.

[0189] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de desprotección o "desacoplamiento" de un grupo reactivo antes de la conjugación. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la liberación de un grupo reactivo con luz, seguido de una

reacción de conjugación. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un residuo aralquilo que comprende uno o más grupos nitro. En algunas realizaciones, la liberación de un grupo reactivo da como resultado una

5 amina libre, sulfuro u otro grupo reactivo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la liberación de un grupo reactivo con un catalizador de metal de transición, seguido de una reacción de conjugación. En algunas realizaciones, el

10 catalizador de metal de transición comprende paladio y uno o más ligandos. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un residuo alilo. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un carbamato alílico. En algunas realizaciones, un grupo

15 reactivo está protegido con un residuo propargílico. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un carbamato de propargilo. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un dienófilo, en donde, la exposición a un dieno (tal como una tetrazina) da como

20 resultado la desprotección del grupo reactivo.

[0190] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción dirigida por ligando, en la que un ligando (opcionalmente) unido a un

grupo reactivo) facilita el sitio de conjugación entre el grupo reactivo y el péptido de citocina. En algunas realizaciones, el ligando se escinde durante o después de la reacción del péptido de citocina con el grupo reactivo. En

5 algunas realizaciones, el sitio de conjugación del péptido de citocina es un aminoácido natural. En algunas realizaciones, el sitio de conjugación del péptido de citocina es una lisina, cisteína o serina. En algunas realizaciones, el sitio de conjugación del péptido de citocina es un aminoácido no

10 natural descrito aquí. En algunas realizaciones, el grupo reactivo comprende un grupo saliente, tal como un grupo arilo o heteroarilo pobre en electrones. En algunas realizaciones, el grupo reactivo comprende un grupo saliente, tal como un grupo alquilo pobre en electrones que es desplazado por el

15 péptido de citocina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un agente atrapador de radicales con una especie radical. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una

20 reacción de adición de radicales oxidativos. En algunas realizaciones, un agente atrapador de radicales es una arilamina. En algunas realizaciones, una especie radical es un radical tirosilo. En algunas realizaciones, las especies radicales son generadas por un catalizador de rutenio (como

[Ru(bpy)3]) y la luz.

[0191] Las reacciones enzimáticas se usan opcionalmente para las reacciones de conjugación descritas en el presente documento. Las conjugaciones enzimáticas ejemplares incluyen la conjugación mediada por SortA, una conjugación mediada por TGs o una conjugación mediada por FGE. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la ligadura de proteínas nativas (NPL) de un grupo terminal 1-amino-2-tio con un tioéster para formar un enlace amida.

[0192] En el presente documento se describen diversas reacciones de conjugación para hacer reaccionar un enlazador o residuo conjugante con un péptido de citocina, en donde, la reacción se produce con un aminoácido natural ("canónico") en el péptido de citocina. En algunas realizaciones, el aminoácido natural se encuentra en una posición de conjugación se encuentra en una secuencia de tipo salvaje, o alternativamente la posición ha sido mutada. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la formación de un enlace disulfuro en un residuo de cisteína. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una reacción de adición de 1,4 Michael de una cisteína o lisina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una ligadura de cianobenzotiazol de una

cisteína. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reticulación con un residuo acetona, tal como 1,3-dicloro-2-propionona. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una adición de 1,4 Michael a una deshidroalanina, formada por reacción de cisteína con O-mesitilenosulfonilhidroxilamina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de una tirosina con un triazolinadiona (TAD) o derivado de TAD. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de un triptófano con un carbenoide de rodio.

Métodos De Uso

Enfermedad O Trastorno Autoinmune

[0193] En algunas realizaciones, también se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad o trastorno autoinmune en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) descrito Aquí en. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido de IL-2 aislado y purificado y un residuo conjugado, en donde, el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida a la subunidad β del receptor de IL-2 (IL-2R β), receptor de IL-2 Subunidad γ (IL-2R γ), o una combinación de las mismas, en relación con un polipéptido de

tipo salvaje IL-2. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido de IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en un residuo de aminoácido seleccionado de P2,

5 T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103,

10 M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el residuo de aminoácido se selecciona de K8, K9, Q11, L12, E15, H16,

15 L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133. En algunos casos, el residuo de aminoácido se selecciona de K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126. En algunos casos, el conjugado IL-

20 2 interactúa con un complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma$, pero con una afinidad reducida hacia las subunidades IL-2R β e IL-2R γ , o disminuirá el reclutamiento de la subunidad γ de IL-2R a la IL-2/Complejo IL-2R β . En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado mantiene la afinidad de unión hacia IL-2R α con

respecto a un polipéptido IL-2 de tipo salvaje. En tales casos, el complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ estimula o mejora la expansión de las células Treg CD4+. En casos adicionales, el polipéptido IL-2 modificado aumenta la dosis requerida para la activación de las células Teff o NK a través del complejo IL-2R $\beta\gamma$, expandiendo así los rangos de dosis para la activación de las células Treg a través del complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (o expandiendo la ventana terapéutica de la IL-2 para la activación de las células Treg a través del complejo IL-2R $\alpha\beta\gamma$).

[0194] En algunos casos, la enfermedad o trastorno autoinmune comprende alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, dermatomiositis, diabetes tipo 1, artritis idiopática juvenil, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, uveítis, vitiligo o genoma de Wegener.

[0195] En algunos casos, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, interleucina, IFN o TNF) a un sujeto que tiene alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune,

hepatitis autoinmune, dermatomiositis, diabetes tipo 1, artritis idiopática juvenil, glomerulonefritis, Graves' enfermedad, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de lúteo, síndrome de lúteo, edema de útero, vitiligo o granulomatosis de Wegener.

- 10** [0196] En algunos casos, se administra un conjugado de IL-2 a un sujeto que tiene alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, dermatomiositis, diabetes tipo 1, artritis idiopática juvenil, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, idiopático
- 15** púrpura trombocitopénica, miastenia gravis, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, escleroderma, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso, artritis de granulometría, lúteo
- 20** sistémico. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene diabetes tipo 1. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene la enfermedad de Graves. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene esclerosis

múltiple. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene psoriasis. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene artritis reumatoide. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto con síndrome de Sjögren. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene lupus eritematoso sistémico. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto que tiene uveítis. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto con granulomatosis de Wegener.

[0197] En algunos casos, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

[0198] En algunas realizaciones, se administra adicionalmente un agente terapéutico adicional al sujeto. En algunos casos, el agente terapéutico adicional se administra simultáneamente con un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2). En otros casos, el agente terapéutico adicional y el conjugado de citocina (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se administran secuencialmente, por ejemplo, el conjugado de citocina (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se administra antes del agente terapéutico adicional o que el conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-

2) se administra después de la administración del agente terapéutico adicional.

[0199] Los agentes terapéuticos adicionales ejemplares para el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides tales como prednisona, budesonida o prednisolona; inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina o tacrolimus; inhibidores de mTOR tales como sirolimus o everolimus; Inhibidores de IMDH tales como azatioprina, leflunomida o micofenolato; productos biológicos como abatacept, adalimumab, anakinra, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, ixekizumab, natalizumab, rituximab, secukinumab, tocilizumab, ustekinumab o vedolizumab; y anticuerpos monoclonales como basiliximab, daclizumab o muromonab.

[0200] En algunos casos, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) con un agente terapéutico adicional seleccionado de un corticosteroide tal como prednisona, budesonida o prednisolona; un inhibidor de calcineurina tal como ciclosporina o tacrolimus; un inhibidor de mTOR tal como sirolimus o everolimus; un inhibidor de IMDH tal como azatioprina, leflunomida o micofenolato; un producto biológico como abatacept, adalimumab, anakinra, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, ixekizumab, natalizumab, rituximab, secukinumab, tocilizumab, ustekinumab o

vedolizumab; y un anticuerpo monoclonal como basiliximab, daclizumab o muromonab.

Métodos De Expansión De La Población Celular

[0201] En algunas realizaciones, se describen adicionalmente
5 en el presente documento métodos para expandir una población de células Treg. En algunos casos, el método comprende poner en contacto una célula con un conjugado de citocina descrito en el presente documento e interactuar la citocina con un receptor de citocina para formar un complejo, en donde, el
10 complejo estimula la expansión de una población de linfocitos distinta.

[0202] En algunas realizaciones, el método de expansión de la población de células T reguladoras CD4⁺ (Treg) comprende poner en contacto una célula con un polipéptido IL-
15 2 aislado y modificado descrito anteriormente durante un tiempo suficiente para inducir la formación de un complejo con un IL-2R $\alpha\beta\gamma$, estimulando así la expansión de la población de células Treg. En algunas realizaciones, el método para expandir una población de células Treg CD4⁺ comprende (a)
20 poner en contacto una célula con un conjugado de IL-2 descrito aquí; y (b) interactuar el conjugado IL-2 con las subunidades IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ para formar un complejo IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$; en donde el conjugado IL-2 tiene una afinidad disminuida a las subunidades IL-2R β e IL-2R γ , o disminuye el

reclutamiento de la subunidad IL-2R γ al complejo IL-2/IL-2R β , y en donde la IL-2/IL- El complejo 2R $\alpha\beta\gamma$ estimula la expansión de las células Treg. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido de IL-2 aislado y

5 purificado; y un residuo conjugado que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en un residuo de aminoácido seleccionado de P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57,

10 E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133, en donde la numeración de los

15 residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el residuo de aminoácido se selecciona de K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132 y T133. En algunos casos,

20 el residuo de aminoácido se selecciona de P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112 y

T113. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95 y Q126. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de K8, K9 y H16. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de Q22, N26, N88 y Q126. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de E15, D20, D84 y E95. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de L12, L19, M23 y F78. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de Q22 y N26.

[0203] En algunos casos, el conjugado IL-2 expande las células reguladoras T CD4+ (Treg) en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más. En algunos casos, el conjugado IL-2 expande las células reguladoras T CD4+ (Treg) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99 %, o mayor.

[0204] En algunos casos, el conjugado de IL-2 expande las células reguladoras T CD4+ (Treg) al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces o más. En algunos casos, el conjugado IL-2 expande las células reguladoras T CD4+ (Treg) en aproximadamente 1 vez, 2 veces,

3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces o más.

- 5** [0205] En algunos casos, el tiempo suficiente para inducir la formación de un complejo con una IL-2R $\alpha\beta\gamma$ es al menos 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En algunos casos, el tiempo suficiente para inducir la formación de un complejo con un IL-2R $\alpha\beta\gamma$ es de aproximadamente 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días.

[0206] En algunas realizaciones, el método es un método in vivo.

[0207] En otras realizaciones, el método es un método in vitro.

- 20** [0208] En realizaciones adicionales, el método es un método ex vivo.

Producción De Polipéptidos De Citoquinas

[0209] En algunos casos, los polipéptidos de citocinas (por ejemplo, interleucina, IFN o TNF) descritos aquí, que

contienen una mutación de aminoácidos natural o una mutación de aminoácidos no natural, se generan de forma recombinante o se sintetizan químicamente. En algunos casos, los polipéptidos de citocina (por ejemplo, IL-2) descritos en el presente documento se generan de manera recombinante, por ejemplo, mediante un sistema de células huésped o en un sistema libre de células.

[0210] En algunos casos, los polipéptidos de citocina (por ejemplo, IL-2) se generan de forma recombinante a través de un sistema de células huésped. En algunos casos, la célula huésped es una célula eucariota (por ejemplo, células de mamíferos, células de insectos, células de levadura o células vegetales) o una célula procariota (por ejemplo, una bacteria grampositiva o una bacteria gramnegativa). En algunos casos, una célula huésped eucariota es una célula huésped de mamífero. En algunos casos, una célula huésped de mamífero es una línea celular estable, o una línea celular que ha incorporado un material genético de interés en su propio genoma y tiene la capacidad de expresar el producto del material genético después de muchas generaciones de división celular. En otros casos, una célula huésped de mamífero es una línea celular transitoria, o una línea celular que no ha incorporado un material genético de interés en su propio genoma y no tiene la capacidad de expresar el producto del

material genético después de muchas generaciones de células. división.

[0211] Las células huésped ejemplares de mamífero incluyen la línea celular 293T, la línea celular 293A, la
 5 línea celular 293FT, las células 293F, las células 293F, las células A549, las células MDCK, las células CHO DG44, las células CHO-S, las células CHO-K1, las células Expi293F™, Línea celular Flp-In™ T-REx™ 293, línea celular Flp-In™-293, línea celular Flp-In™-3T3, línea celular Flp-In™-BHK, línea
 10 celular Flp-In™-CHO, Flp-In™-CV-1 línea celular, línea celular Flp-In™-Jurkat, células FreeStyle™ 293-F, células FreeStyle™ CHO-S, línea celular GripTite™ 293 MSR, línea celular GS-CHO, células HepaRG™, Línea celular T-REx™ Jurkat, células Per.C6, línea celular T-REx™-293, línea celular T-
 15 REx™-CHO y línea celular T-REx™-HeLa.

[0212] En algunas realizaciones, una célula huésped eucariota es una célula huésped de insecto. Las células huésped de insecto ejemplares incluyen células Drosophila S2, células Sf9, células Sf21, células High Five™ y células
 20 expresSF+®.

[0213] En algunas realizaciones, una célula huésped eucariota es una célula huésped de levadura. Las células huésped de levadura ejemplares incluyen cepas de levadura Pichia pastoris tales como GS115, KM71H, SMD1168, SMD1168H y

X-33, y cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como INVSc1.

[0214] En algunas realizaciones, una célula huésped eucariota es una célula huésped de planta. En algunos casos, las células vegetales comprenden una célula de algas. Las líneas celulares de plantas ejemplares incluyen cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* 137c o *Synechococcus elongatus* PPC 7942.

[0215] En algunas realizaciones, una célula huésped es una célula huésped procariota. Las células huésped procariotas ejemplares incluyen BL21, Mach1™, DH10B™, TOP10, DH5α, DH10Bac™, OmniMax™, MegaX™, DH12S™, INV110, TOP10F', INVαF, TOP10/P3, ccdB Survival, PIR1, PIR2, Stbl2™, Stbl3™ o Stbl4™.

[0216] En algunos casos, las moléculas o vectores de ácido polinucleico adecuados para la producción de un polipéptido IL-2 descrito en el presente documento incluyen cualquier vector adecuado derivado de una fuente eucariota o procariota. Ejemplos de moléculas o vectores de ácido polinucleico incluyen vectores de bacterias (por ejemplo, *E. coli*), insectos, levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*), algas o fuente de mamíferos. Los vectores bacterianos incluyen, por ejemplo, pACYC177, pASK75, series de vectores pBAD, series de vectores pBADM, series de vectores pET,

series de vectores pETM, series de vectores pGEX, pHAT, pHAT2, pMal-c2, pMal-p2, series de vectores pQE, pRSET A, pRSET B, pRSET C, pTrcHis2 series, pZA31-Luc, pZE21-MCS-1, pFLAG ATS, pFLAG CTS, pFLAG MAC, pFLAG Shift-12c, pTAC-MAT-1,
5 pFLAG CTC o pTAC-MAT-2.

[0217] Los vectores de insectos incluyen, por ejemplo, pFastBac1, pFastBac DUAL, pFastBac ET, pFastBac HTa, pFastBac HTb, pFastBac HTc, pFastBac M30a, pFastBact M30b, pFastBac, M30c, pVL1392, pVL13, pVL13, pVL13, pVL13, pVL13 Vectores
10 FLAG como pPolh-FLAG1 o pPolh-MAT 2, o vectores MAT como pPolh-MAT1 o pPolh-MAT2.

[0218] Los vectores de levadura incluyen, por ejemplo, el vector Gateway® pDEST™ 14, el vector Gateway® pDEST™ 15, el vector Gateway® pDEST™ 17, el vector Gateway® pDEST™ 24,
15 el vector Gateway® pYES-DEST52, el pBAD-DEST49 Gateway® vector de destino, pAO815 vector de Pichia, pFLD1 vector de Pichi pastoris, pGAPZA, B y C vector de Pichia pastoris, vector de PPIC3.5K Pichia, vector de PPIC6 A, B y C Pichia, vector de pPIC9K Pichia, pTEF1/Zeo, vector de levadura pYES2,
20 vector de levadura pYES2/CT, vector de levadura pYES2/NT A, B y C, o vector de levadura pYES3/CT.

[0219] Los vectores de algas incluyen, por ejemplo, el vector pChlamy-4 o el vector MCS.

[0220] Los vectores de mamífero incluyen, por ejemplo,

vectores de expresión transitorios o vectores de expresión, estables. Los ejemplos de vectores de expresión transitoria en mamíferos incluyen p3xFLAG-CMV 8, pFLAG-Myc-CMV 19, pFLAG-Myc-CMV 23, pFLAG-CMV 2, pFLAG-CMV 6a, b, c, pFLAG-CMV 5.1, 5 pFLAG-CMV 5a, b, c, p3xFLAG-CMV 7.1, pFLAG-CMV 20, p3xFLAG-Myc-CMV 24, pCMV-FLAG-MAT1, pCMV-FLAG-MAT2, pBICEP-CMV 3 o pBICEP-CMV 4. Los ejemplos de vectores de expresión estable en mamíferos incluyen pFLAG-CMV 3, p3xFLAG-CMV 9, p3xFLAG-CMV 13, pFLAG-Myc-CMV 21, p3xFLAG-Myc-CMV 25, pFLAG-CMV 4, 10 p3xFLAG-CMV 10, p3xFLAG-CMV 14, pFLAG-Myc-CMV 22, p3xFLAG-Myc-CMV 26, pBICEP-CMV 1 o pBICEP-CMV 2.

[0221] En algunos casos, se usa un sistema libre de células para la producción de un polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) descrito aquí. En algunos casos, un sistema 15 libre de células comprende una mezcla de componentes citoplasmáticos o nucleares de una célula y es adecuado para la síntesis in vitro de ácido nucleico. En algunos casos, un sistema libre de células utiliza componentes de células procariotas. En otros casos, un sistema libre de células 20 utiliza componentes de células eucariotas. La síntesis de ácido nucleico se obtiene en un sistema libre de células basado, por ejemplo, en células de *Drosophila*, huevo de *Xenopus*, *Archaea* o células HeLa. Los sistemas exentos de células ejemplares incluyen el sistema de *E. coli* S30

Extract, el sistema E. coli T7 S30 o PURExpress®, XpressCF y XpressCF+.

[0222] Los sistemas de traducción sin células comprenden diversos componentes tales como plásmidos, ARNm, ADN, ARNt, sintetasas, factores de liberación, ribosomas, proteínas chaperonas, factores de iniciación y elongación de la traducción, aminoácidos naturales o no naturales, u otros componentes. utilizado para la expresión de proteínas. Tales componentes se modifican opcionalmente para mejorar los rendimientos, aumentar la velocidad de síntesis, aumentar la fidelidad del producto proteico o incorporar aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, las citocinas descritas en el presente documento se sintetizan usando sistemas de traducción sin células descritos en el documento US 8,778,631; US 2017/0283469; Estados Unidos 2018/0051065; Estados Unidos 2014/0315245; o US 8.778.631. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción sin células comprenden factores de liberación modificados, o incluso la delección de uno o más factores de liberación del sistema. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción sin células comprenden una concentración reducida de proteasa. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción sin células comprenden ARNt modificados con codones reasignados utilizados para codificar aminoácidos no naturales. En

algunas realizaciones, las sintetetasas descritas en el presente documento para la incorporación de aminoácidos no naturales se usan en sistemas de traducción sin células. En algunas realizaciones, los ARNt se cargan previamente con aminoácidos no naturales usando métodos enzimáticos o químicos antes de agregarlos a un sistema de traducción libre de células. En algunas realizaciones, los componentes para un sistema de traducción libre de células se obtienen de organismos modificados, tales como bacterias modificadas, levaduras u otros organismos.

[0223] En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) se genera como una forma circular permutada, ya sea a través de un sistema huésped de expresión o mediante un sistema libre de células.

15 Producción De Polipéptido De Citocina Que Comprende Un Aminoácido No Natural

[0224] Se puede usar un código genético ortogonal o expandido en la presente descripción, en donde, uno o más codones específicos presentes en la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) se asignan para codificar el aminoácido no natural de modo que puede incorporarse genéticamente en la citocina (por ejemplo, IL-2) mediante el uso de un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. El par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal es capaz

de cargar un ARNt con un aminoácido no natural y es capaz de incorporar ese aminoácido no natural en la cadena de polipéptidos en respuesta al codón.

[0225] En algunos casos, el codón es el codón ámbar, ocre, opal o un codón cuádruple. En algunos casos, el codón corresponde al ARNt ortogonal que se usará para transportar el aminoácido no natural. En algunos casos, el codón es ámbar. En otros casos, el codón es un codón ortogonal.

[0226] En algunos casos, el codón es un codón cuádruple, que puede decodificarse mediante un ribosoma ribo-Q1 ortogonal. En algunos casos, el codón cuádruple es como se ilustra en Neumann, et al., "Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome," [Codificación de múltiples aminoácidos no naturales mediante la evolución de un ribosoma de decodificación cuádruple], Nature, 464 (7287):441-444 (2010).

[0227] En algunos casos, un codón usado en la presente descripción es un codón recodificado, por ejemplo, un codón sinónimo o un codón raro que se reemplaza con un codón alternativo. En algunos casos, el codón recodificado es como se describe en Napolitano, et al., "Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in *Escherichia coli*," [Reglas emergentes para la elección de codones aclaradas mediante la edición de codones de argine

raros en *Escherichia coli*], PNAS, 113 (38):E5588-5597 (2016). En algunos casos, el codón recodificado es como se describe en Ostrov et al., "Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome," [Diseño, síntesis y prueba hacia un genoma de 57 codones], Science 353 (6301):819-822 (2016).

[0228] En algunos casos, se utilizan ácidos nucleicos no naturales que conducen a la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en la citocina (por ejemplo, IL-2). Los ejemplos de ácidos nucleicos no naturales incluyen, pero no se limitan a, uracil-5-ilo, hipoxantina-9-ilo (I), 2-aminoadenin-9-ilo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otros 8-adeninas y guaninas sustituidas, 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Ciertos ácidos nucleicos no naturales, como pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y

purinas N-2 sustituidas, purinas N-6 sustituidas, purinas O-6
 sustituidas, 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, 5-
 propinilcitosina, 5-metilcitosina, aquellos que aumentan la
 estabilidad de la formación de dúplex, ácidos nucleicos
5 universales, ácidos nucleicos hidrófobos, ácidos nucleicos
 promiscuos, ácidos nucleicos de tamaño expandido, ácidos
 nucleicos fluorados, pirimidinas 5-sustituidas, 6-
 azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, que
 incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-
10 propinilocitosina, 5-metilcitosina (5-me-C), 5- hidroximetil
 citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo,
 otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y
 otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-
 tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo, 5-
15 halocitosina, 5-propinil ($-C\equiv C-CH_3$) uracilo, 5-propinil
 citosina, otros derivados alquínílicos de ácidos nucleicos de
 pirimidina, 6-azo uracilo, 6-azo citosina, 6-azo timina, 5-
 uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-
 tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas
20 8-sustituidas, 5-halo, particularmente, 5-bromo, 5-
 trifluorometilo, otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-
 metilguanina, 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina,
 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina,
 3-deazaguanina, 3-deazaadenina, pirimidinas tricíclicas,

fenoxazina citidina ([5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona),
 fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-
 2(3H)-ona), abrazaderas G, fenoxazina citidina (por ejemplo,
 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona),
5 carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona),
 piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrol[2,3-
 d]pirimidin-2-ona), aquellos en los que la base de purina o
 pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, 7-deaza-
 adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina, 2-piridona,
10 azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina,
 citosina clorada, ciclocitosina, arabinósido de citosina, 5-
 fluorocitosina, fluoropirimidina, 5,6-fluorouracilo,
 fluorouracilo, fluorouracilo, 5,6-fluorouracilo
 dihidrocitosina, 5-yodocitosina, hidroxiiurea, yodouracilo, 5-
15 nitrocitosina, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-
 fluorouracilo y 5-yodouracilo, 2-amino-adenina, 6-tio-
 guanina, 2-tio-timina, 4-tio-timina, 5-propinil-uracilo, 4-
 tio-uracilo, N4-etilcitosina, 7-deazaguanina, 7-deaza-8-
 azaguanina, 5-hidroxycitosina, 2'-desoxiuridina, 2-amino-2'-
20 desoxiadenosina, y los descritos en las patentes de los
 Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,845,205; 4,910,300;
 4,948,882; 5,093,232; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273;
 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908;
 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121;

- 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 and 6,005,096; WO 99/62923; Kandimalla y col., (2001) Bioorg. Medicina. Chem 9: 807-813; The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch y col., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y Sanghvi, Capítulo 15, Antisense Research and Applications [Investigación y aplicaciones antisentido], Crooke and Lebleu Eds., CRC Press, 1993, 273-288. Se pueden encontrar modificaciones de bases adicionales, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 3,687,808; Englisch y col., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y Sanghvi, Capítulo 15, Antisense Research and Applications [Investigación y aplicaciones antisentido], páginas 289-302, Crooke y Lebleu ed., CRC Press, 1993.

- [0229] Los ácidos nucleicos no naturales que comprenden diversas bases heterocíclicas y diversos residuos de azúcar (y análogos de azúcar) están disponibles en la técnica, y los ácidos nucleicos en algunos casos incluyen una o varias bases heterocíclicas distintas de Los cinco componentes básicos principales de los ácidos nucleicos naturales. Por ejemplo, la base heterocíclica incluye, en algunos casos, uracilo-5-ilo, citosina-5-ilo, adenina-7-ilo, adenina-8-ilo, guanina-7-ilo, guanina-8-ilo, grupos 4-aminopirrol[2.3-d]pirimidin-5-

ilo, 2-amino-4-oxopirrol[2,3-d]pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrol[2.3-d]pirimidin-3-ilo, donde las purinas se unen al residuo de azúcar del ácido nucleico a través de la posición 9, las pirimidinas a través de la posición 1, las
5 pirrolopirimidinas a través de la posición 7 y las pirazolopirimidinas a través de la posición 1.

[0230] En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos también se modifican en el residuo fosfato. Los residuos de fosfato modificados incluyen, pero no se limitan
10 a, aquellos con modificación en el enlace entre dos nucleótidos y contienen, por ejemplo, un fosforotioato, fosforotioato quirral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, metilo y otros alquilfosfonatos incluyendo fosfonato de 3'-alquileo y fosfonatos quirales,
15 fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos. Se entiende que estos enlaces fosfato o fosfato modificado entre dos
20 nucleótidos son a través de un enlace 3'-5' o un enlace 2'-5', y el enlace contiene polaridad invertida como 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan cómo hacer y usar nucleótidos que

contienen fosfatos modificados e incluyen, entre otros,
 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196;
 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717;
 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233;
5 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306;
 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; y 5,625,050.

[0231] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales incluyen 2',3'-didesoxi-2',3'-didehidro-nucleósidos (PCT/US2002/006460), derivados de ADN y ARN sustituidos en
10 5' (PCT/US2011/033961); Saha et al., J. Org Chem., 1995, 60, 788-789; Wang et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9, 885-890; y Mikhailov et al., Nucleosides & Nucleotides, 1991, 10 (1-3), 339-343; Leonid et al., 1995, 14 (3-5), 901-905; y Eppacher et al., Helvetica Chimica Acta,
15 2004, 87, 3004-3020; PCT/JP2000/004720; PCT/JP2003/002342; PCT/JP2004/013216; PCT/JP2005/020435; PCT/JP2006/315479; PCT/JP2006/324484; PCT/JP2009/056718; PCT/JP2010/067560), o 5' monómeros sustituidos hechos como monofosfato con bases modificadas (Wang et al., Nucleosides Nucleotides & Nucleic
20 Acids, 2004, 23 (1 y 2), 317-337).

[0232] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales incluyen modificaciones en la posición 5' y la posición 2' del anillo de azúcar (PCT/US94/02993), tal como 5'-CH₂-sustituido protegido con 2'-O nucleósidos (Wu et al.,

Helvetica Chimica Acta, 2000, 83, 1127-1143 y Wu et al.,
 Bioconjugate Chem. 1999, 10, 921-924). En algunos casos, los
 ácidos nucleicos no naturales incluyen dímeros de nucleósidos
 unidos a amida que se han preparado para su incorporación en
 5 oligonucleótidos en los que el nucleósido unido a 3' en el
 dímero (5' a 3') comprende un 2'-OCH₃ y un 5'-(S)-CH₃
 (Mesmaeker et al., Synlett, 1997, 1287-1290). Los ácidos
 nucleicos no naturales pueden incluir nucleósidos modificados
 con 5'-CH₂ (u O) sustituidos en 2' (PCT/US92/01020). Los
 10 ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros de ADN
 y ARN de 5'-metilenfosfonato y dímeros (Bohringer y col.,
 Tet. Lett., 1993, 34, 2723-2726; Collingwood y col., Synlett,
 1995, 7, 703-705; y Hutter y col., Helvetica Chimica Acta,
 2002, 85, 2777-2806). Los ácidos nucleicos no naturales
 15 pueden incluir monómeros de 5'-fosfonato que tienen una
 sustitución de 2' (US2006/0074035) y otros monómeros de 5'-
 fosfonato modificados (WO1997/35869). Los ácidos nucleicos no
 naturales pueden incluir monómeros de metilenofosfonato
 modificados en 5' (EP614907 y EP629633). Los ácidos nucleicos
 20 no naturales pueden incluir análogos de ribonucleósidos 5' o
 6'-fosfonato que comprenden un grupo hidroxilo en la posición
 5' o 6' (Chen et al., Phosphorus, Sulphur and Silicon
 [Fósforo, Sulfuro y Silicón], 2002, 777, 1783-1786; Jung y
 col., Bioorg. Med. Chem., 2000, 8, 2501-2509; Gallier y col.,

Eur. J. Org. Chem., 2007, 925-933; y Hampton y col., J. Med. Chem., 1976, 19 (8), 1029-1033). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros y dímeros de 5'-fosfonato desoxirribonucleósido, que tienen un grupo 5'-fosfato (Nawrot et al., Oligonucleotides [Oligonucleótidos], 2006, 16 (1), 68-82). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir nucleósidos que tienen un grupo 6'-fosfonato en donde, la posición 5' o 6' no está sustituida o está sustituida con un grupo tio-terc-butilo ($\text{SC}(\text{CH}_3)_3$) (y sus análogos); un grupo metilenoamino (CH_2NH_2) (y sus análogos) o un grupo ciano (CN) (y sus análogos) (Fairhurst y col., Synlett, 2001, 4, 467-472; Kappler y col., J. Med. Chem., 1986, 29, 1030-1038; Kappler et al., J. Med. Chem., 1982, 25, 1179-1184; Vrudhula et al., J. Med. Chem., 1987, 30, 888-894; Hampton et al., J. Med. Chem., 1976, 19, 1371-1377; Geze et al., J. Am. Chem. Soc, 1983, 105 (26), 7638-7640; y Hampton et al., J Am. Chem. Soc, 1973, 95 (13), 4404-4414).

[0233] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales también incluyen modificaciones del residuo azúcar. En algunos casos, los ácidos nucleicos contienen uno o más nucleósidos en los que se ha modificado el grupo de azúcar. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir una mayor estabilidad de la nucleasa, una mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa. En ciertas

realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden un residuo de anillo de ribofurano modificado químicamente. Los ejemplos de anillos de ribofurano químicamente modificados incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluidos los grupos sustituyentes 5' o 2'; puente de dos átomos en el anillo para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S C(R₁)(R₂) (R=H, C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector), y combinaciones de los mismos. Pueden encontrarse ejemplos de azúcares modificados químicamente en WO2008/101157, US2005/0130923, y WO2007/134181.

[0234] En algunos casos, un ácido nucleico modificado comprende azúcares modificados o análogos de azúcar. Por lo tanto, además de la ribosa y la desoxirribosa, el residuo de azúcar puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa o un grupo ciclopentilo "análogo" de azúcar. El azúcar puede estar en forma de piranosilo o furanosilo. El residuo de azúcar puede ser el furanosilo de ribosa, desoxirribosa, arabinosa o 2'-O-alquilribosa, y el azúcar puede unirse a las bases heterocíclicas respectivas en configuración anomérica [alfa] o [beta]. Las modificaciones de azúcar incluyen, pero no se limitan a, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN.

Por ejemplo, una modificación de azúcar puede incluir 2'-O-metil-uridina o 2'-O-metil-citidina. Las modificaciones de azúcar incluyen desoxirribonucleósidos sustituidos con 2'-O-alquilo y ribonucleósidos similares a 2'-O-etilenglicol. Se conoce la preparación de estos azúcares o análogos de azúcar y los respectivos "nucleósidos" en los que dichos azúcares o análogos están unidos a una base heterocíclica (base de ácido nucleico). Las modificaciones de azúcar también se pueden hacer y combinar con otras modificaciones.

- 10** [0235] Las modificaciones al residuo de azúcar incluyen modificaciones naturales de la ribosa y la desoxi ribosa, así como modificaciones no naturales. Las modificaciones de azúcar incluyen, entre otras, las siguientes modificaciones en la posición 2: OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-
- 15** alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden estar sustituidos o no sustituidos de C₁ a C₁₀, alquilo o alqueno y alquino de C₂ a C₁₀. Las modificaciones de azúcar 2' también incluyen pero no se limitan a-O[(CH₂)_nO]_m CH₃,
- 20** -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nCH₃, -O(CH₂)_nONH₂, y -O(CH₂)_nON[(CH₂)_n CH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10.

[0236] Otras modificaciones en la posición 2' incluyen, pero no se limitan a: alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo

inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino,

5 sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades

10 similares. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el azúcar, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos unidos de 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los azúcares modificados también

15 incluyen aquellos que contienen modificaciones en el oxígeno del anillo puente, como CH₂ y S. Los análogos de azúcar de nucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar como residuos ciclobutilo en lugar del azúcar pentafulanosilo. Existen numerosas patentes de los Estados Unidos que enseñan

20 la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas y que detallan y describen un rango de modificaciones de bases, tales como las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427;

5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873;
 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 4,845,205; 5,130,302;
 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187;
 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540;
5 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; y
 5,700,920, cada una de los cuales se incorpora aquí como
 referencia en su totalidad.

[0237] Los ejemplos de ácidos nucleicos que tienen
 residuos de azúcar modificados incluyen, sin limitación,
10 ácidos nucleicos que comprenden 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S),
 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y Grupos sustituyentes O(CH₂)₂OCH₃. El
 sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar
 entre alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-(alquilo C₁-C₁₀),
 OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n),
15 donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀
 sustituido o no sustituido.

[0238] En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos
 descritos en el presente documento incluyen uno o más ácidos
 nucleicos bicíclicos. En ciertas realizaciones de este tipo,
20 el ácido nucleico bicíclico comprende un puente entre los
 átomos del anillo ribosilo 4'y 2'. En ciertas realizaciones,
 los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento
 incluyen uno o más ácidos nucleicos bicíclicos en los que el
 puente comprende un ácido nucleico bicíclico de 4'a 2'. Los

ejemplos de dichos ácidos nucleicos bicíclicos de 4' a 2' incluyen, entre otros, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', y análogos de los mismos (ver, Patente de

5 Estados Unidos No. 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' y sus análogos, (ver WO2009/006478, WO2008/150729, US2004/0171570, Patente de los Estados Unidos No. 7,427,672, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 209, 74, 118-134 y WO2008/154401). Ver también, por ejemplo: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4,

10 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Medicina. Chem Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava y col., J. Am. Chem Soc., 2007, 129 (26)

15 8362-8379; Elayadi y col., Curr. Opinión Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch y col., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Oram y col., Curr. Opinión Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,849,513; 5,015,733; 5,118,800; 5,118,802; 7,053,207; 6,268,490; 6,770,748; 6,794,499;

20 7,034,133; 6,525,191; 6,670,461; y 7,399,845; Publicaciones internacionales Nos. WO2004/106356, WO1994/14226, WO2005/021570, WO2007/090071 y WO2007/134181; Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos Nos. US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; Solicitudes provisionales de

Estados Unidos Nos. 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 y 61/099,844; y las Solicitudes Internacionales Nos. PCT/US2008/064591, PCT US2008/066154, PCT US2008/068922 y PCT/DK98/00393.

- 5** [0239] En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos unidos. Los ácidos nucleicos pueden unirse entre sí utilizando cualquier enlace de ácido nucleico inter. Las dos clases principales de grupos de enlace de ácido inter nucleico se definen por la presencia o
- 10** ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces representativos de ácido nucleico que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos ($P = S$). Los grupos de enlace de ácido inter nucleico representativos que no contienen
- 15** fósforo incluyen, pero no se limitan a, metilenometilimino ($-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$), tiodiéster ($-OC(O)-S-$), tioncarbamato ($-OC(O)(NH)-S-$); siloxano ($-O-Si(H)_2-O-$); y N,N^* -dimetilhidrazina ($-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-$). En ciertas realizaciones, los enlaces de ácidos inter nucleicos que
- 20** tienen un átomo quiral se pueden preparar como una mezcla racémica, como enantiómeros separados, por ejemplo, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los ácidos nucleicos no naturales pueden contener una sola modificación. Los ácidos nucleicos no naturales pueden contener múltiples

modificaciones dentro de uno de los residuos o entre diferentes residuos.

[0240] Las modificaciones del fosfato de la estructura al ácido nucléico incluyen, pero no se limitan a, metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato (puente o no puente), fosfotriéster, fosforoditioato, fosfoditioato y boranofosfato, y se pueden usar en cualquier combinación. También se pueden usar otros enlaces no fosfato.

[0241] En algunas realizaciones, las modificaciones de la estructura (por ejemplo, enlaces internucleotídicos de metilfosfonato, fosforotioato, fosforoamidato y fosforoditioato) pueden conferir actividad inmunomoduladora sobre el ácido nucléico modificado o mejorar su estabilidad in vivo.

[0242] En algunos casos, un derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) está unido al residuo de azúcar o análogo de azúcar y puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato o similares. Se pueden encontrar polinucleótidos ejemplares que contienen enlaces fosfato modificados o enlaces no fosfato en Peyrottes et al., 1996, Nucleic Acids Res. [Ácidos nucléicos res.] 24:1841-1848; Chaturvedi et al., 1996, Nucleic Acids Res. [Ácidos nucléicos res.] 24:2318-2323; y en Schultz et al., (1996) Nucleic Acids

Res. [Ácidos nucleicos res.] 24:2966-2973; Matteucci, 1997, "Oligonucleotide Analogs: an Overview" [Análogos de oligonucleótidos: una visión general] en *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (Chadwick and Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NY; Zon, 1993, "Oligonucleoside Phosphorothioates" [Fosforotioatos oligonucleósidos] en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties*, Humana Press, pp. 165-190; Miller et al., 1971, JACS 93:6657-6665; Jager et al., 1988, Biochem. 27:7247-7246; Nelson et al., 1997, JOC 62:7278-7287; U.S. Patent No. 5,453,496; and Micklefield, 2001, Curr. Med. Chem. 8: 1157-1179.

[0243] En algunos casos, la modificación de la estructura comprende reemplazar el enlace fosfodiéster con un residuo alternativo tal como un grupo aniónico, neutro o catiónico. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen: enlace aniónico internucleosídico; modificación de fosforamidato de N3 a P5; ADN de boranofosfato; prooligonucleótidos; enlaces internucleosídicos neutros tales como metilfosfonatos; ADN unido a amida; enlaces metileno (metilimino); enlaces formacetales y tioformacetales; estructuras que contienen grupos sulfonilo; oligos morfolino; ácidos nucleicos peptídicos (PNA); y oligos de guanidina desoxirribonucleica cargada positivamente (DNG) (Micklefield,

2001, Current Medicinal Chemistry 8:1157-1179). Un ácido nucleico modificado puede comprender una cadena principal quimérica o mixta que comprende una o más modificaciones, p. una combinación de enlaces de fosfato tales como una
5 combinación de enlaces de fosfodiéster y fosforotioato.

[0244] Los sustitutos para el fosfato incluyen, por ejemplo, enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más
10 enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formacetil y
15 tioformacetil; estructuras de metileno formacetilo y tioformacetilo; estructuras que contienen alquenos; estructuras de sulfamato; estructuras de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; amida columna vertebral; y otros que tienen componentes
20 mixtos de N, O, S y CH₂. Numerosas patentes de los Estados Unidos revelan cómo hacer y usar estos tipos de reemplazos de fosfato e incluyen, entre otros, las patentes estadounidenses números 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731;

- 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045;
 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046;
 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737;
 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013;
5 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963;
 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536;
 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723;
 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785;
 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371;
10 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 and 5,688,941.

También se entiende en un sustituto de nucleótidos que tanto los residuos de azúcar como de fosfato del nucleótido pueden reemplazarse, por ejemplo, por un enlace de tipo amida (aminoetilglicina) (PNA). Patentes de los Estados Unidos Nos.

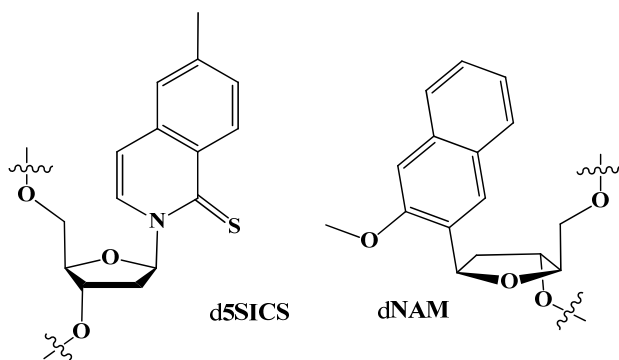
15 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262 enseñan cómo hacer y usar moléculas de PNA, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia. Ver también Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500. También es posible vincular otros tipos de moléculas (conjugados) a nucleótidos o análogos de

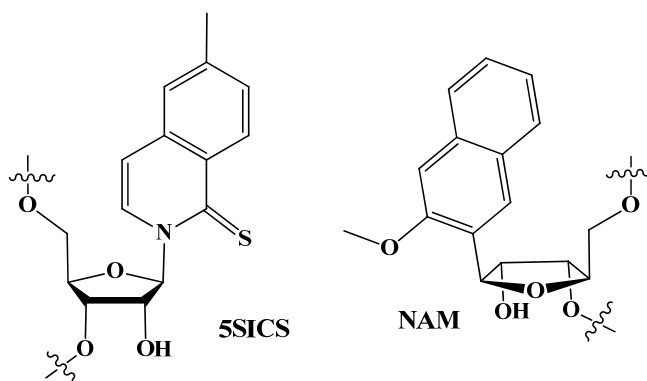
20 nucleótidos para mejorar, por ejemplo, la captación celular. Los conjugados pueden estar químicamente unidos al nucleótido o análogos de nucleótidos. Dichos conjugados incluyen, pero no se limitan a, residuos lipídicos tales como un residuo colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., Ann. KY. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecadiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EM50J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1-di-O-hexadecil-rac-glicerol-SH-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un residuo palmitilo (Mishra et al., Biochem. Biophys Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan la preparación de tales conjugados e incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313;

5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731;
 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077;
 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044;
 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941;
5 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830;
 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136;
 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250;
 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203,
 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552;
10 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726;
 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

[0245] En algunos casos, los ácidos nucleicos no naturales forman además pares de bases no naturales. Los ejemplos de nucleótidos no naturales capaces de formar un par de bases de ADN o ARN (UBP) no naturales en condiciones in vivo incluyen, pero no se limitan a, 5SICS, d5SICS, NAM, dNAM y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los nucleótidos no naturales incluyen:





[0246] En algunas realizaciones, un par de bases no naturales genera un aminoácido no natural descrito en Dumas et al., "Designing logical codon reassignment - Expanding the chemistry in biology," [Diseño de reasignación de codones lógicos-Expanding la química en biología], Chemical Science, 6: 50-69 (2015).

[0247] La célula huésped en la que se introducen las construcciones o vectores descritos en este documento se cultiva o mantiene en un medio adecuado tal que se produzca el ARNt, la ARNt sintetasa y la proteína de interés. El medio también comprende el (los) aminoácido (s) no natural (s) de tal manera que la proteína de interés incorpora el (los) aminoácido (s) no natural (es).

[0248] El par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal carga un ARNt con un aminoácido no natural e incorpora el aminoácido no natural en la cadena del polipéptido en respuesta al codón. Los ejemplos de pares de aaRS-ARNt incluyen, entre otros, pares de aaRS/ARNt de *Methanococcus jannaschii* (Mj-

Tyr), E. coli TyrRS (Ec-Tyr)/B. pares de ARNtCUA
 stearothermophilus, E. coli LeuRS (Ec-Leu)/B.
 stearothermophilus pares de ARNtCUA y pares de pirrolisil-
 ARNt.

- 5** [0249] Se prepara un polipéptido de citocina (por
 ejemplo, IL-2) que comprende uno o más aminoácidos no
 naturales mediante la introducción de las construcciones de
 ácido nucléico descritas en el presente documento que
 comprenden el ARNt y la ARNt sintetasa y que comprenden una
10 secuencia de ácido nucléico de interés con uno o más en
 marcos de codones ortogonales (stop) en una célula huésped.
 La célula huésped se expone a una solución fisiológica que
 comprende los aminoácidos no naturales, y las células huésped
 se mantienen luego en condiciones que permiten la expresión
15 de la secuencia codificante de la proteína de interés. Los
 aminoácidos no naturales se incorporan a la cadena de
 polipéptidos en respuesta al codón. Por ejemplo, uno o más
 aminoácidos no naturales se incorporan al polipéptido de
 citocina (por ejemplo, IL-2). Alternativamente, se pueden
20 incorporar dos o más aminoácidos no naturales en el
 polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) en dos o más
 sitios en la proteína.

[0250] Cuando se van a incorporar múltiples aminoácidos
 no naturales en un polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-

2), se entenderá que se necesitarán múltiples codones en la secuencia de ácido nucléico codificante en las posiciones deseadas de manera que el ARNt los pares de sintetasa/ARNt pueden dirigir la incorporación de los aminoácidos no naturales en respuesta a los codones. Al menos 1, 2, 3, 4 o más ácidos nucléicos que codifican codones pueden incorporarse en la secuencia de ácido nucléico de interés.

[0251] Cuando se desea incorporar más de un tipo de aminoácido no natural en la proteína de interés en una sola proteína, se puede usar un segundo o más par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para incorporar el segundo o más aminoácido no natural; adecuadamente dicho segundo o más par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal reconoce un codón diferente en el ácido nucléico que codifica la proteína de interés para que los dos o más aminoácidos no naturales puedan incorporarse específicamente en diferentes sitios definidos en la proteína en una sola etapa de fabricación. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se pueden usar dos o más pares de ARNt-ARNt sintetasa ortogonales.

[0252] Una vez que el polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) que incorpora el (los) aminoácido (s) no natural (s) se ha producido en la célula huésped, puede extraerse de él mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen enzimática, química o lisis

osmótica e interrupción física. El polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) puede purificarse mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como cromatografía preparativa, purificación por afinidad o cualquier otra
5 técnica adecuada.

[0253] Las células huésped adecuadas pueden incluir células bacterianas (por ejemplo, E. coli), pero las células huésped más adecuadas son células eucariotas, por ejemplo células de insecto (por ejemplo, Drosophila como Drosophila
10 melanogaster), células de levadura, nematodos (por ejemplo, C elegans), ratones (por ejemplo, Mus musculus), o células de mamífero (como las células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS, células 293T humanas, células HeLa, células NIH 3T3 y células de eritroleucemia de ratón (MEL)) o células
15 humanas u otras células eucariotas. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas. Adecuadamente, la célula huésped es una célula de mamífero, como una célula humana o una célula de insecto.

[0254] Otras células huésped adecuadas que pueden usarse
20 generalmente en las realizaciones de la invención son las mencionadas en la sección de ejemplos. El ADN del vector puede introducirse en las células huésped mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y

"transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas bien reconocidas para introducir una molécula de ácido nucléico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo fosfato cálcico o cloruro de calcio.

5 precipitación, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped son bien conocidos en la técnica.

[0255] Al crear líneas celulares, generalmente se
10 prefiere que se preparen líneas celulares estables. Por ejemplo, para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para
15 identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para resistencia a los antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren
20 resistencia a fármacos, como G418, higromicina o metotrexato. Las moléculas de ácido nucléico que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula huésped en el mismo vector o pueden introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de manera estable con la molécula de

ácido nucléico introducida pueden identificarse mediante la selección del fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

- 5 [0256] En una realización, las construcciones descritas en el presente documento están integradas en el genoma de la célula huésped. Una ventaja de la integración estable es que se logra la uniformidad entre células individuales o clones. Otra ventaja es que la selección de los mejores productores
- 10 puede llevarse a cabo. Por consiguiente, es deseable crear líneas celulares estables. En otra realización, las construcciones descritas en el presente documento se transfectan en una célula huésped. Una ventaja de transfectar las construcciones en la célula huésped es que se pueden
- 15 maximizar los rendimientos de proteínas. En un aspecto, se describe una célula que comprende la construcción de ácido nucléico o el vector descrito aquí.

Composiciones Y Formulaciones Farmacéuticas

- [0257] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica
- 20 y las formulaciones descritas en el presente documento se administran a un sujeto por múltiples vías de administración, que incluyen, pero no se limitan a, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), intracerebral, oral, intranasal, bucal, rectal, vía de administración sublingual o

transdérmica.

[0258] En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, dispersiones líquidas acuosas, dispersiones autoemulsionantes, soluciones
5 sólidas, dispersiones liposomales, aerosoles, formas de dosificación sólidas, polvos, formulaciones de liberación inmediata, formulaciones de liberación controlada, rápido
formulaciones de fusión, tabletas, cápsulas, píldoras, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de
10 liberación prolongada, formulaciones de liberación pulsátil, formulaciones multiparticuladas (por ejemplo, formulaciones de nanopartículas) y formulaciones mixtas de liberación inmediata y controlada.

[0259] En algunas realizaciones, las formulaciones
15 farmacéuticas incluyen un vehículo o materiales de vehículo seleccionados en base a la compatibilidad con la composición descrita en este documento, y las propiedades del perfil de liberación de la forma de dosificación deseada. Los materiales de soporte ejemplares incluyen, por ejemplo,
20 aglutinantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración, agentes de relleno, tensioactivos, solubilizantes, estabilizadores, lubricantes, agentes humectantes, diluyentes y similares. Los materiales de soporte farmacéuticamente compatibles incluyen, entre otros,

acacia, gelatina, dióxido de silicio coloidal, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnesio, polivinilpirrolidona (PVP), colesterol, ésteres de colesterol, caseinato de sodio, lecitina de soja, taurocólico ácido, fosfotidilcolina, cloruro de sodio, fosfato tricálcico, fosfato de dipotasio, celulosa y conjugados de celulosa, azúcares estearoil lactilato de sodio, carragenano, monoglicérido, diglicérido, almidón pregelatinizado y similares. Ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, decimonovena edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995), Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975, Liberman, DECIR AH y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980, y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams y Wilkins, 1999).

[0260] En algunos casos, la composición farmacéutica se formula como un inmunoliposoma, que comprende una pluralidad de conjugados de IL-2 unidos directa o indirectamente a la bicapa lipídica de liposomas. Los lípidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos; fosfolípidos; esteroides tales como colesterol; esfingolípidos tales como esfingomielina; glicosfingolípidos tales como gangliósidos, globocidas y cerebrósidos; aminas tensioactivas tales como

aminas de estearilo, oleilo y linoleilo. En algunos casos, el
 lípido comprende un lípido catiónico. En algunos casos, el
 lípido comprende un fosfolípido. Los fosfolípidos ejemplares
 incluyen, pero no se limitan a, ácido fosfatídico ("PA"),
5 fosfatidilcolina ("PC"), fosfatidilglicerol ("PG"),
 fosfatidiletanolamina ("PE"), fosfatidilinositol ("PI") y
 fosfatidilserina ("PI") y fosfatidilserina ("PS"),
 esfingomielina (incluida la esfingomielina del cerebro),
 lecitina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina,
10 cerebrósidos, diaraquidoilfosfatidilcolina ("DAPC"),
 didecanoil-L-alfa-fosfatidilcolina ("DDPCil"), fosfato de
 metilo ("DDPCilid"), diloleoilfosfatidilcolina,
 dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),
 dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"),
15 dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"),
 diaraquidoilfosfatidilglicerol ("DAPG"), didecanoil-L-alfa-
 fosfatidilglicerol ("DDPG"), dielaidoilfosfatidilglicerol
 ("DEPG"), dilauroilfosfatidilglicerol ("DGLP"),
 dilinoleoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol
20 ("DMPG"), dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG"),
 dipalmitoilfosfatidilglicerol ("DPPG"),
 diestearoilfosfatidilglicerol ("DSPG"), 1-palmitoil-2-oleoil-
 fosfatidilglicerol ("POPG"),
 diaraquidoilfosfatidiletanolamina ("DAPE"), didecanoil-L-

	alfa-fosfatidiletanolamina	("DDPE"),
	dielaidoilfosfatidiletanolamina	("DEPE"),
	dilauroilfosfatidiletanolamina	("DLPE"),
	dilinoilfosfatidiletanolamina,	
5	dimiristoilfosfatidiletanolamina	("DMPE"),
	dioleilfosfatidiletanolamina	("DOPE"),
	dipalmitoilfosfatidiletanolamina	("DPPE"),
	diestearoilfosfatidiletanolamina	("DSPE"),
	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina	("POPE"),
10	diaraquidilfosfatidilinositol	("DAPI"),
	didecanoil-L-alfa-fosfatidilinositol	("DEPI"),
	(difosfatidilinositol)	
	dilauroilfosfatidilinositol	("DLPI"),
	dilinoilfosfatidilinositol,	
	dimiristoilfosfatidilinositol	
	("DMPI"),	
	dioleilfosfatidilinositol	("DOPI"),
15	dipalmitoilfosfatidilinositol	("DPPI"),
	distearoilfosfatidilinositol	("DSPI"),
	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilinositol	("POPI"),
	diaraquidilfosfatidilserina	
	("DAPS"),	
	didecanoil-L-alfa-fosfatidilserina	("DDPS"),
	dielaidilfosfatidilserina	("DEPS"),
20	dilauroilfosfatidilserina	("DLPS"),
	dilinoilfosfatidilserina,	
	dimiristoilfosfatidilserina	
	("DMPS"),	
	dioleilfosfatidilserina	("DOPS"),
	dipalmitoilfosfatidilserina	("DPPS"),
	diestearoilfosfatidilserina	("DSPS"),
	1-palmitoil-2-oleoil-	

fosfatidilserina ("POPS"), diaraquidoil esfingomielina,
 didecanoil esfingomielina, dielaidoil esfingomielina,
 dilauroil esfingomielina, dilinoleoil esfingomielina,
 dimiristoil esfingomielina, esfingomielina, dioleoil
5 esfingomielina, dipalmitoil esfingomielina, diestearoil
 esfingomielina y 1-palmitoil-2-oleoil-esfingomielina.

[0261] En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas
 incluyen además agentes de ajuste de pH o agentes tamponantes
 que incluyen ácidos tales como ácidos acético, bórico,
10 cítrico, láctico, fosfórico e clorhídrico, bases tales como
 hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio,
 citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio y tris-
 hidroximetilaminometano, y tampones como citrato/dextrosa,
 bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. Dichos ácidos,
15 bases y tampones se incluyen en una cantidad requerida para
 mantener el pH de la composición en un rango aceptable.

[0262] En algunos casos, la formulación farmacéutica
 incluye una o más sales en una cantidad requerida para llevar
 la osmolalidad de la composición a un rango aceptable. Dichas
20 sales incluyen las que tienen cationes de sodio, potasio o
 amonio y aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato,
 fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito, las
 sales adecuadas incluyen cloruro de sodio, cloruro de
 potasio, tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y sulfato de

amonio.

[0263] En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, azúcares como trehalosa, sacarosa, manitol, maltosa, glucosa o sales como fosfato de potasio, citrato de sodio, sulfato de amonio u otros agentes tales como heparina para aumentar la solubilidad y la estabilidad in vivo de los polipéptidos.

[0264] En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas incluyen además diluyente que se usa para estabilizar compuestos porque pueden proporcionar un entorno más estable. Las sales disueltas en soluciones tamponadas (que también pueden proporcionar control o mantenimiento del pH) se utilizan como diluyentes en la técnica, incluida, entre otras, una solución salina tamponada con fosfato. En ciertos casos, los diluyentes aumentan el volumen de la composición para facilitar la compresión o crean un volumen suficiente para una mezcla homogénea para el llenado de la cápsula. Dichos compuestos pueden incluir, por ejemplo, lactosa, almidón, manitol, sorbitol, dextrosa, celulosa microcristalina como Avicel®, fosfato de calcio dibásico, dihidrato de fosfato dicálcico, fosfato tricálcico, fosfato de calcio, lactosa anhidra, lactosa secada por pulverización, almidón pregelatinizado, azúcar comprimible, tales como Di-Pac® (Amstar), manitol, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato

de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, diluyentes a base de sacarosa, azúcar de confitería, monohidrato de sulfato de calcio monobásico, dihidrato de sulfato de calcio, trihidrato de lactato de calcio, dextratos, sólidos de cereales
5 hidrolizados, amilosa, polvo de celulosa, carbonato de calcio, glicina, caolín, manitol, cloruro de sodio, inositol, bentonita y similares.

[0265] En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas incluyen agentes de desintegración o desintegrantes para
10 facilitar la ruptura o desintegración de una sustancia. El término "desintegrar" incluye tanto la disolución como la dispersión de la forma de dosificación cuando se pone en contacto con fluido gastrointestinal. Los ejemplos de agentes de desintegración incluyen un almidón, por ejemplo, un
15 almidón natural como el almidón de maíz o el almidón de papa, un almidón pregelatinizado como National 1551 o Amijel®, o almidón glicolato de sodio como Promogel® o Explotab®, una celulosa como una madera producto, celulosa metilcristalina, por ejemplo, Avicel®, Avicel® PH101, Avicel® PH102, Avicel®
20 PH105, Elcema® P100, Emcocel®, Vivacel®, Ming Tia® y Solka-Floc®, metilcelulosa, croscarmelosa o una cruz celulosa unida, tal como carboximetilcelulosa de sodio reticulada (Ac-Di-Sol®), carboximetilcelulosa reticulada, o croscarmelosa reticulada, un almidón reticulado tal como almidón glicolato

de sodio, un polímero reticulado tal como crospovidona, una polivinilpirrolidona reticulada, alginato como ácido algínico o una sal de ácido algínico como alginato de sodio, una arcilla como Veegum® HV (silicato de aluminio y magnesio),
5 una goma como agar, guar, algarroba, Karaya, pectina, o tragacanto, almidón glicolato de sodio, bentonita, una esponja natural, un tensioactivo, una resina tal como una resina de intercambio catiónico, pulpa de cítricos, laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio en almidón
10 combinado, y similares.

[0266] En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas incluyen agentes de relleno tales como lactosa, carbonato de calcio, fosfato de calcio, fosfato de calcio dibásico, sulfato de calcio, celulosa microcristalina, polvo de
15 celulosa, dextrosa, dextros, dextrano, almidones, almidón pregelatinizado, sacarosa, xilitol, lactitol, manitol, sorbitol, cloruro de sodio, polietilenglicol y similares.

[0267] Los lubricantes y deslizantes también se incluyen opcionalmente en las formulaciones farmacéuticas descritas
20 aquí para prevenir, reducir o inhibir la adhesión o fricción de los materiales. Los lubricantes ejemplares incluyen, por ejemplo, ácido esteárico, hidróxido de calcio, talco, estearilfumerato de sodio, un hidrocarburo como el aceite mineral o aceite vegetal hidrogenado como el aceite de soja

hidrogenado (Sterotex®), ácidos grasos superiores y sus metales alcalinos y alcalinotérreos. sales metálicas, como aluminio, calcio, magnesio, zinc, ácido esteárico, estearatos de sodio, glicerol, talco, ceras, Stearowet®, ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, un polietilenglicol (por ejemplo, PEG- 4000) o un metoxipolietilenglicol como Carbowax™, oleato de sodio, benzoato de sodio, gliceril behenato, polietilenglicol, lauril sulfato de magnesio o sodio, sílice coloidal como Syloid™, Cab-O-Sil®, un almidón como el almidón de maíz, aceite de silicona, un tensioactivo y similares.

[0268] Los plastificantes incluyen compuestos utilizados para ablandar el material de microencapsulación o los recubrimientos de película para hacerlos menos frágiles. Los plastificantes adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicoles tales como PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350 y PEG 800, ácido esteárico, propilenglicol, ácido oleico, trietilcelulosa y triacetina. Los plastificantes también pueden funcionar como agentes dispersantes o agentes humectantes.

[0269] Los solubilizantes incluyen compuestos tales como triacetina, citrato de trietilo, oleato de etilo, acetato de caprilato, sodio lauril sulfato, sodio docusato, vitamina E TPGS, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-

hidroxietilpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, n-butanol, alcohol isopropílico, colesterol, sales biliares, polietilenglicol 200-600, glicofurol, transcitol, 5 propilenglicol y dimetil isosorbida y similares.

[0270] Los estabilizadores incluyen compuestos tales como cualquier agente antioxidante, tampones, ácidos, conservantes y similares. Los estabilizadores ejemplares incluyen clorhidrato de L-arginina, trometamina, albúmina 10 (humana), ácido cítrico, alcohol bencílico, fenol, bifosfato disódico deshidratado, propilenglicol, metacresol o m-cresol, acetato de zinc, polisorbato-20 o Tween® 20, o trometamol.

[0271] Los agentes de suspensión incluyen compuestos tales como polivinilpirrolidona, por ejemplo, 15 polivinilpirrolidona K12, polivinilpirrolidona K17, polivinilpirrolidona K25 o polivinilpirrolidona K30, copolímero de vinilpirrolidona/acetato de vinilo (S630), polietilenglicol, por ejemplo, aproximadamente 300 a aproximadamente 6000, o aproximadamente 3350 a 20 aproximadamente 4000, o aproximadamente 7000 a aproximadamente 5400, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de acetato de hidroximetilcelulosa, polisorbato-80, hidroxietilcelulosa, alginato de sodio, gomas, tales como,

por ejemplo, goma de tragacanto y goma acacia, goma guar, xantanos, incluida la goma xantana, azúcares, celulósicos, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, 5 hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polisorbato-80, alginato de sodio, poliatoxilato de sorbitán, povidona y similares.

[0272] Los tensioactivos incluyen compuestos tales como laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, Tween 60 u 80, 10 triacetina, vitamina E TPGS, monooleato de sorbitán, monooleato de sorbitán polioxietilenado, polisorbatos, polaxómeros, sales biliares, monoestearato de glicerilo, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno., por ejemplo, Pluronic® (BASF), y similares. Los tensioactivos 15 adicionales incluyen glicéridos de ácidos grasos de polioxietileno y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno (60) y alquiléteres de polioxietileno y éteres de alquilfenilo, por ejemplo, octoxinol 10, octoxinol 40. A veces, los tensioactivos se 20 incluyen para mejorar la estabilidad física o para otros fines.

[0273] Los agentes potenciadores de la viscosidad incluyen, por ejemplo, metilcelulosa, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa,

hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de acetato de
 hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de
 hidroxipropilmetilcelulosa, carbómero, alcohol polivinílico,
 alginatos, acacias, quitosanos y combinaciones de los mismos.

- 5 [0274] Los agentes humectantes incluyen compuestos tales
 como ácido oleico, monoestearato de glicerilo, monooleato de
 sorbitán, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina,
 monooleato de polioxietilen sorbitán, monolaurato de
 polioxietilen sorbitano, docusato de sodio, oleato de sodio,
 10 lauril sulfato de sodio, trihidrato, docus de sodio, tricato
 de sodio, triceto de sodio, vitamina E TPGS, sales de amonio
 y similares.

Regímenes Terapéuticos

- [0275] En algunas realizaciones, las composiciones
 15 farmacéuticas descritas en el presente documento se
 administran para aplicaciones terapéuticas. En algunas
 realizaciones, la composición farmacéutica se administra una
 vez al día, dos veces al día, tres veces al día o más. La
 composición farmacéutica se administra diariamente, todos los
 20 días, cada día alternativo, cinco días a la semana, una vez a
 la semana, cada dos semanas, dos semanas al mes, tres semanas
 al mes, una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes,
 o más. La composición farmacéutica se administra durante al
 menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7

meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 3 años o más.

[0276] En el caso en que el estado del paciente mejora, a discreción del médico, la administración de la composición se administra de forma continua, alternativamente, la dosis de la composición que se administra se reduce temporalmente o se suspende temporalmente durante un cierto período de tiempo (es decir, un "descanso de medicamento"). En algunos casos, la duración de las vacaciones de fármacos varía entre 2 días y 1 año, incluso a modo de ejemplo, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 28 días, 35 días, 50 días, 70 días, 100 días, 120 días, 150 días, 180 días, 200 días, 250 días, 280 días, 300 días, 320 días, 350 días o 365 días. La reducción de la dosis durante un feriado de fármacos es del 10% al 100%, que incluye, solo a modo de ejemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%.

[0277] Una vez que se ha producido una mejora de las condiciones del paciente, se administra una dosis de mantenimiento si es necesario. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en donde, se conserve la enfermedad, trastorno o afección mejorada.

[0278] En algunas realizaciones, la cantidad de un

agente dado que corresponde a dicha cantidad varía dependiendo de factores tales como el compuesto particular, la gravedad de la enfermedad, la identidad (por ejemplo, peso) del sujeto o huésped que necesita tratamiento, pero sin
5 embargo se determina de manera rutinaria de una manera conocida en la técnica de acuerdo con las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo, por ejemplo, el agente específico que se administra, la ruta de administración y el sujeto o huésped que se trata. En algunos
10 casos, la dosis deseada se presenta convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas simultáneamente (o durante un corto período de tiempo) o en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

15 [0279] Los rangos anteriores son meramente sugestivos, ya que el número de variables con respecto a un régimen de tratamiento individual es grande, y no son infrecuentes excursiones considerables de estos valores recomendados. Dichas dosis se alteran dependiendo de una serie de
20 variables, sin limitarse a la actividad del compuesto utilizado, la enfermedad o afección a tratar, el modo de administración, los requisitos del sujeto individual, la gravedad de la enfermedad o afección a tratar. y el juicio del practicante.

[0280] En algunas realizaciones, la toxicidad y la eficacia terapéutica de tales regímenes terapéuticos se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, que incluyen, pero no se limitan a, la determinación de la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se expresa como la relación entre LD50 y ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se usan para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED50 con toxicidad mínima. La dosificación varía dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

Kits/Artículo de Fabricación

[0281] Se describen en el presente documento, en ciertas realizaciones, kits y artículos de fabricación para usar con uno o más métodos y composiciones descritos en el presente documento. Dichos kits incluyen un portador, paquete o contenedor que está compartimentado para recibir uno o más

contenedores, como viales, tubos y similares, cada uno de los contenedores comprende uno de los elementos separados que se utilizarán en un método descrito aquí. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y

5 tubos de ensayo. En una realización, los contenedores están formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

[0282] Los artículos de fabricación proporcionados en este documento contienen materiales de embalaje. Los ejemplos

10 de materiales de envasado farmacéutico incluyen, entre otros, envases blíster, botellas, tubos, bolsas, recipientes, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo de administración y tratamiento previsto.

15 [0283] Por ejemplo, el (los) recipiente (s) incluyen uno o más de los polipéptidos de citocina (por ejemplo, IL-2) o conjugados de citocina (por ejemplo, IL-2) descritos aquí, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticos descritos en este documento para facilitar el suministro de

20 polipéptidos de citocinas (por ejemplo, IL-2) o conjugados de citocinas (por ejemplo, IL-2). Dichos kits incluyen opcionalmente una descripción o etiqueta de identificación o instrucciones relacionadas con su uso en los métodos descritos en este documento.

[0284] Un kit típicamente incluye etiquetas que enumeran contenidos o instrucciones de uso, e insertos de paquete con instrucciones de uso. Por lo general, también se incluirá un conjunto de instrucciones.

- 5 [0285] En una realización, una etiqueta está en o asociada con el recipiente. En una realización, una etiqueta está en un contenedor cuando las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta están adheridos, moldeados o grabados en el propio contenedor, una etiqueta está
- 10 asociada con un contenedor cuando está presente dentro de un receptáculo o portador que también contiene el contenedor, por ejemplo, como un inserto de paquete. En una realización, se usa una etiqueta para indicar que los contenidos se usarán para una aplicación terapéutica específica. La etiqueta
- 15 también indica instrucciones para el uso de los contenidos, como en los métodos descritos en este documento.

- [0286] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se presentan en un paquete o dispositivo dispensador que contiene una o más formas de dosificación
- 20 unitarias que contienen un compuesto proporcionado aquí. El paquete, por ejemplo, contiene papel de aluminio o plástico, como un blíster. En una realización, el paquete o dispositivo dispensador está acompañado de instrucciones para la administración. En una realización, el paquete o dispensador

también está acompañado de un aviso asociado con el contenedor en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, dicho aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma del Medicamento para la administración humana o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, es el etiquetado aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los EE. UU. Para medicamentos, o el inserto del producto aprobado. En una realización, las composiciones que contienen un compuesto proporcionado aquí formulado en un vehículo farmacéutico compatible también se preparan, se colocan en un recipiente apropiado y se etiquetan para el tratamiento de una afección indicada.

Ciertas Terminologías

[0287] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece el tema reivindicado. Debe entenderse que la descripción detallada es solo ejemplar y explicativa y no es restrictiva de ningún tema reclamado. En esta aplicación, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Debe notarse que, como se usa en la especificación, las formas singulares "el, la", "uno, una" y

"lo", incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluido", así como otras formas, como "incluir" e "incluye", no es limitante.

[0288] Aunque se pueden describir varias características de la invención en el contexto de una sola realización, las características también se pueden proporcionar por separado o en cualquier combinación adecuada. Por el contrario, aunque la invención puede describirse en el presente documento en el contexto de realizaciones separadas para mayor claridad, la invención también puede implementarse en una única realización.

[0289] La referencia en la especificación a "algunas realizaciones", "una realización", "una realización" u "otras realizaciones" significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con las realizaciones está incluida en al menos algunas realizaciones, pero no necesariamente todas las realizaciones, de las invenciones.

[0290] Como se usa en el presente documento, los intervalos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o intervalo particular. Acerca de también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto,

"aproximadamente 5 μ L" significa "aproximadamente 5 μ L" y también "5 μ L". Generalmente, el término "aproximadamente" incluye una cantidad que se esperaría que estuviera dentro del error experimental, por ejemplo, dentro del 15%, 10% o 5%.

[0291] Los encabezados de sección utilizados en este documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

[0292] Como se usa en el presente documento, los términos "individuo (s)", "sujeto (s)" y "paciente (s)" significan cualquier mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano. En algunas realizaciones, el mamífero es un no humano. Ninguno de los términos requiere o se limita a situaciones caracterizadas por la supervisión (por ejemplo, constante o intermitente) de un trabajador de la salud (por ejemplo, un médico, una enfermera registrada, una enfermera practicante, un asistente médico, un trabajador de enfermería o un hospicio).

[0293] Como se usa en el presente documento, el término "significativo" o "significativamente" en referencia a la afinidad de unión significa un cambio en la afinidad de unión de la citocina (por ejemplo, polipéptido IL-2) suficiente para afectar la unión de la citocina (por ejemplo, IL-2 polipéptido) a un receptor diana. En algunos casos, el

término se refiere a un cambio de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. En algunos casos, el término significa un cambio de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más.

[0294] En algunos casos, el término "significativo" o "significativamente" en referencia a la activación de una o más poblaciones celulares a través de un complejo de señalización de citocinas significa un cambio suficiente para activar la población celular. En algunos casos, el cambio para activar la población celular se mide como una potencia de señalización del receptor. En tales casos, se puede proporcionar un valor EC50. En otros casos, se puede proporcionar un valor ED50. En casos adicionales, se puede proporcionar una concentración o dosificación de la citocina.

[0295] Como se usa en el presente documento, el término "potencia" se refiere a la cantidad de una citocina (por ejemplo, polipéptido IL-2) requerida para producir un efecto diana. En algunos casos, el término "potencia" se refiere a la cantidad de citocina (por ejemplo, Polipéptido IL-2) requerida para activar un receptor de citocina diana (por ejemplo, Receptor IL-2). En otros casos, el término "potencia" se refiere a la cantidad de citocina (por ejemplo, polipéptido IL-2) requerida para activar una población de

células diana. En algunos casos, la potencia se mide como ED50 (dosis efectiva 50), o la dosis requerida para producir el 50% de un efecto máximo. En otros casos, la potencia se mide como EC50 (Concentración efectiva 50), o la dosis
 5 requerida para producir el efecto objetivo en el 50% de la población.

Ejemplos

[0296] Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no para limitar el alcance de las
 10 reivindicaciones proporcionadas en el presente documento.

Ejemplo 1

[0297] **Ensayos De Dimerización Del Receptor De Quinasas Y Citoquinas**

[0298] **Manejo de Células**

15 [0299] Las líneas celulares PathHunter se expandieron de las existencias de congelador de acuerdo con procedimientos estándar. Las células se sembraron en un volumen total de 20 µl en microplacas de 384 pozos de paredes blancas y se incubaron durante el tiempo apropiado antes de la prueba.

20 [0300] **Formato agonista**

[0301] Para la determinación del agonista, las células se incubaron con una muestra para inducir la respuesta. La dilución intermedia de las muestras almacenadas se realizó para generar una muestra 5X en el tampón de ensayo. Se

añadieron aproximadamente 5 µl de muestra 5X a las células y se incubaron a 37°C durante 6 a 16 horas, dependiendo del ensayo. La concentración del vehículo fue del 1%.

[0302] **Detección de Señal**

- 5 [0303] La señal de ensayo se generó a través de una sola adición de 12.5 o 15 µl (50% v/v) de cóctel de reactivos de detección PathHunter para ensayos de agonista y antagonista respectivamente, seguido de una incubación de una hora a temperatura ambiente. Para algunos ensayos, la actividad se
- 10 detectó utilizando un reactivo de detección de alta sensibilidad (PathHunter Flash Kit) para mejorar el rendimiento del ensayo. En estos ensayos, se añadió un volumen igual de reactivo de detección (25 o 30 µl) a los pocillos, seguido de una incubación de una hora a temperatura
- 15 ambiente. Las microplacas se leyeron después de la generación de la señal con un instrumento PerkinElmer Envision™ para la detección de señales de aroma de quimioluminiscencia.

[0304] **Análisis de Datos**

- [0305] La actividad del compuesto se analizó usando el
- 20 conjunto de análisis de datos CBIS (ChemInnovation, CA). Para los ensayos en modo agonista, el porcentaje de actividad se calculó utilizando la siguiente fórmula:

% Actividad = 100% x (RLU media de la muestra de prueba- RLU media del control del vehículo) / (ligando de control MAX RLU

promedio- RLU media del control del vehículo).

[0306] Para los ensayos en modo antagonista, se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula:

% Inhibición = 100% x (1-(RLU media de la muestra de prueba-
 5 RLU media del control del vehículo) / (RLU media del control
 EC80- RLU media del control del vehículo)).

Ejemplo 2

[0307] Perfil De Respuesta Inmune Ex Vivo De Compuestos Ejemplares De IL-2 En Muestras De PBMC Derivadas Del Sistema De Reducción De Leucocitos Humanos Primarios (LRS)

[0308] Para determinar cómo la especificidad diferencial del receptor de los compuestos ejemplares de IL-2 afecta la activación de las subpoblaciones de células inmunes primarias, se realizaron perfiles de concentración-respuesta
 15 de la activación de linfocitos en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de LRS humanas usando varios colores citometría de flujo. Estos estudios se realizaron en PrimityBio LLC (Fremont, CA). Los linfocitos primarios derivados de muestras de LRS humanas se
 20 trataron con series de diluciones de compuestos ejemplares de IL-2 y se cuantificaron en base a la señalización de pSTAT5 en cada tipo de células de linfocitos usando el panel que se muestra en la Tabla 1.

Marcador	Población Celular
CD3	Células T
CD4	Células Th
CD8	Células efectoras T
CD45RA	Células T ingenuas
CD56	Células NK
CD14/19	Monocitos/células B
CD25	Tregs o células T experimentadas
CD127	No Treg
CD62L	Memoria T vs célula efectora de memoria T
pSTAT5 (Y694)	Marcador de activación

[0309] Los datos de citometría de flujo se analizaron para la activación de diferentes subconjuntos de células T y NK en modo concentración-respuesta, leyendo la acumulación de pSTAT5 después del tratamiento con una variante ejemplar de IL-2 K9_30kD.

[0310] La Figura 4A-Figura 4B muestra las curvas de respuesta a la dosis para la señalización de pSTAT5 en células primarias LRS humanas (Figura 4A) y la respuesta de proliferación en poblaciones de CTLL-2 de ratón (Figura 4B).

[0311] La Tabla 2 muestra la respuesta a la dosis EC50 para la señalización de pSTAT5 (EC50) en muestras de LRS humanas o proliferación de CTLL-2 tratada con la variante IL-2 indicada.

Compuesto	Células NK	CD8+ Células T	Células Treg	Relación CD8+/Treg	Aumento veces Treg EC50 frente a IL-2 nativo	Proliferación CTLL-2
IL-2 nativo	4586	31024	75	414	1	455.8
K9_30kD	169578	1100679	2217	496	30	504
H16_30kD	2545257	12070108	34976	345	466	80755
L19_30kD	6756768	22436430	93205	241	1243	3510
D20_30kD	2643930	9505217	1129455	8	15059	689939
M23_30kD	143620	539824	1030	524	14	1102
N26_30kD	258531	1188859	2459	483	33	2594
N88_30kD	3298113	11111537	323201	34	4309	66606
E100_30kD	35088	195823	483	405	6	1676
N119_30kD	34010	143380	535	268	11	1215
T123_30kD	33396	152928	269	569	6	255
Q126_30kD	3676807	19722480	29454	670	393	3584
S127_30kD	20210	92190	150	615	3	123
T131_30kD	24207	132922	258	515	3	641
N88R/D109_30kD	2780819	12503386	175805	71	3663	59577
V91K	20537	102255	142	720	3	99.5
N88R	2312847	15025734	11082	1356	148	363

[0312] Los valores de CE50 (pg/ml) se calcularon a partir de las curvas de respuesta a las dosis generadas a partir de las gráficas de MFI.

- 5 [0313] Cambio de potencia de Treg en comparación con la IL-2 nativa (IL-2 de tipo salvaje) realizada en cada experimento individual.

Ejemplo 3

[0314] **Estudio PK En Ratones C57BL/6 Con Tumores**

- 10 [0315] Los detalles experimentales son resúmenes en la Tabla 3.

Grupo	Número de animales	Artículo de prueba/control (dosis)	Ruta, régimen de dosificación	Punto final
1	9	Concentración de IL-2 nativa	IV, dosis única en el	Toma de sangre a 0,08, 0,25, 0,5,

		(tipo salvaje) (3.0 mg/kg) : 0.6 mg/mL	día 0 a T = 0 a 5 ml/kg	1, 2, 4, 8,12, dosis y 24 horas después de la dosis
2	9	K35_30kD (3.0 mg/kg) Concentración: 0.6 mg/mL	IV, dosis única en el día 0 a T = 0 a 5 ml/kg	
3	9	K35_30kD (0.3 mg/kg) Concentración: 0.6 mg/mL	IV, dosis única en el día 0 a T = 0 a 5 ml/kg	
Extra	6	N/A	N/A	Colección de matriz en blanco (sin tiempo)
Total	33			

[0316] Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de un ejemplo de compuesto de IL-2 PEGilado K35_30kD a dos niveles de dosis. El artículo de prueba liofilizado se reconstituyó en PBS, y nueve ratones C57BL/6 machos se dosificaron con 0.3 y 3 mg/kg mediante inyección intravenosa de la vena de la cola para cada grupo de dosis (ver detalles de la colección a continuación). Se recogieron muestras de sangre a las 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la dosis. El kit ELISA hIL-2 de Abcam (ab100566), que no reacciona de forma cruzada con IL-2 de ratón nativo, se usó para la detección y cuantificación de artículos de prueba. Para ajustar las diferencias específicas de ELISA en la sensibilidad de la detección del kit de compuestos nativos y PEGilados, se generaron curvas estándar de artículo de prueba nativo de IL-2 y K35_30kD usando el tampón diluyente del artículo de prueba, y los datos se analizaron con respecto a las curvas estándar respectivas. Los datos

representados representan la media y la SEM de tres muestras individuales (réplicas biológicas) como se describió anteriormente, y los parámetros PK para los artículos de prueba K35_30kD se analizaron y resumieron en la Tabla

5 4.

Analito	Parámetro	Unidad	Dosis	
			0.3 mg/kg	3 mg/kg
			Estimación	
IL-2 K35-mPEG30kD	T _{max}	hr	0.250	0.250
	C _{max}	ng/mL	6080	57700
	AUC _{0-t}	hr*ng/mL	38500	425000
	R ²		0.994	0.947
	AUC _{1/2extrap}	%	35.3	37.4
	AUC _{0-∞}	h*ng/mL	59600	679000
	t _{1/2}	hr	18.2	19.5
	C _{max} /D	kg*ng/mL/mg	20300	19200
	AUC _{0-t} /D	hr*ng/mL	128000	142000

[0317] La Figura 5 muestra un perfil PK mejorado de K35_30kD a dos concentraciones diferentes. Sus perfiles PK se comparan con la IL-2 de tipo salvaje.

10 **Ejemplo 4**

[0318] La Tabla 5 ilustra IL-2 secuencias descritas en este documento.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
IL-2 (homo sapiens) (forma madura)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (homo sapiens) (precursor) NCBI Accesoión No.: AAB46883.1	MYRMQLLSIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL T	2

[0319] Si bien las realizaciones preferidas de la

presente invención, se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Ahora se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones a los expertos en la materia sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.

15

20