CONJUGADOS DE CITOQUINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS E INFECCIOSAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 62/540,781, presentada el 3 de agosto de 2017, que se incorpora aquí como referencia, en su totalidad.

Listado De Secuencias

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí como referencia, en su totalidad. Dicho formato ASCII, creado el 27 de julio de 2018, se llama 46085-710_601_SL.txt y tiene un tamaño de 3,703 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] Las poblaciones distintas de células T modulan el sistema inmunitario para mantener la homeostasis inmune y la tolerancia. Por ejemplo, las células T reguladoras (Treg) previenen respuestas inapropiadas del sistema inmunitario al prevenir la autorreactividad patológica, mientras que las células T citotóxicas atacan y destruyen las células infectadas o cáncerosas. 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 INVENCIÓN

[0004] En el presente documento, en ciertas realizaciones, se encuentran conjugados de citocinas y se usan en el tratamiento de una o más indicaciones. En algunas realizaciones, también se describen en el presente documento los conjugados de interleucina 2 (IL-2) y su uso en el tratamiento de una o más indicaciones. En algunos casos, la una o más indicaciones comprenden cáncer o una infección patógena. En algunos casos, se describen en el presente documento métodos para modular la interacción entre IL-2 y el receptor de IL-2, para estimular o expandir las poblaciones específicas de células T, células asesinas naturales (NK) o células T asesinas naturales (NKT). En casos adicionales, se describen además en el presente documento, composiciones y kits farmacéuticos que comprenden uno o más conjugados de interleucina (por ejemplo, conjugados de IL-2).

[0005] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un conjugado de interleucina 2 (IL-2) que comprende: un polipéptido IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado, en una posición de aminoácidos, seleccionada entre K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En

algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, P65, V69, L72 e Y107. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de T37, T41, F42, F44, Y45, P65, V69, L72 e Y107. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de R38 y K64. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se selecciona de E61, E62 y E68. En algunas realizaciones, la posición de aminoácidos se encuentra en E62. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido seleccionado de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107, es mutado adicionalmente a lisina, cisteína, o histidina. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido es mutado a cisteína. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido es mutado a lisina. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido seleccionado de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107 es mutado adicionalmente a un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende, N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, lisina norborneno, TCO-lisina, lisina metiltetrazina,

aliloxicarbonilisina, 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-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfoniotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonioserina, L-3-(2-naftilo)alanina, ácido propanóico 2-amino-3-((2-((3-(benciloxi)-3-oxopropil)amino)etilo)selanil), 2-amino-3-(fenilselanil)propanóico, o seleniocisteína. En algunas realizaciones, el conjugado IL-2 tiene una afinidad disminuida a la subunidad α (IL-2Rα) del receptor de IL-2, con respecto a un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o una disminución mayor del 99% en la unión afinidad con IL-2Rα en relación con un polipéptido salvaje tipo IL-2. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida 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, 500 veces, 1000 veces o más en relación con un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, el residuo conjugado deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2Rα. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el residuo conjugado adicional comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprende independientemente polietileno glicol (PEG), poli(propileno glicol) (PPG), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, 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, PEG es 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 polisiálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, sulfato de heparán

(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 conjugado 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 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 conjugado 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 un polímero similar a una proteína de gelatina (GLK). 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 indirectamente al polipéptido IL-2 aislado y purificado a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador homobifuncional. En algunas realizaciones, el enlazador homobifuncional comprende reactivo de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis(sulfosuccinimidila propionato) (DTSSP), suberato de disuccinimidila (DSS), bis(sulfosuccinimidila) suberato (BS), tartrato de disuccinimidila (DST), tartrato de disulfosuccinimidila (DST), etilenglicobis (succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de disuccinimidila (DSG), carbonato de N,N'-disuccinimidila (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamida)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (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-azidosalicilamida)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, ácido sulfónico diyodo-p-xileno, 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-succinimidila 3-(2-piridilditio)propionato (sPDP), N-succinimidila 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-sPDP), N-succinimidila 3-(2-piridilditio) propionato de cadena larga soluble en agua (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonilo-α-metilo-α-(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidila-6-[α-metilo-α-(2-piridilditio)toluamida]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimido (MBs), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimido (sulfo-MBs), N-succinimidila(4-yodoacetil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidila(4-yodoacetilo)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidila-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidila-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimido (GMBs), éster N-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimido (sulfo-GMBs), succinimidila 6-((yodoacetilo)amino)hexanoato (sIAX), succinimidila 6-[6-(((yodoacetilo)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX),

succinimidila 4-(((yodoacetilo)amino)metilo)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidila 6-(((((4-yodoacetilo)amino)metilo)ciclohexano-1-carbonilo)amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenilo yodoacetato (NPIA), reticuladores de reactivo de carbonilo y reactivo de sulfhidrilo, tales como, ácido butírico 4-(4-N-maleimidofenilo) hidrazida (MPBH), 4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilo-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio)propionilo hidrazida (PDPH), ácido azidosalicílico N-hidroxisuccinimidila-4 (NHs-AsA), ácido azidosalicílico N-hidroxisulfosuccinimidila-4 (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidila-(4-azidosalicilamida)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidila-2-(ρ-azidosalicilamida)etilo-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidila-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidila-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidila-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidila-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimido (ANB-NOs), sulfosuccinimidila-2-(m-azido-o-nitrobenzamida)-etilo-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidila-4(4-azidofenilo)1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidila(4-azidofenilo)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidila 4-(ρ-azidofenilo)butirato

(sulfo-sAPB), sulfosuccinimidila 2-(7-azido-4-metilcoumarin-3-acetamida)etilo-1,3′-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidila 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), ρ-nitrofenilo diazopiruvato (ρNPDP), ρ-nitrofenilo-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(ρ-azidosalicilamida)-4-(yodoacetamida)butano (AsIB), N-[4-(ρ-azidosalicilamida)butil]-3′-(2′-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, ρ-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(ρ-azidosalicilamida)butilamina (AsBA), o ρ-azidofenilo glioxal (APG). En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador escindible, que comprende opcionalmente un enlazador dipéptido. En algunas realizaciones, el enlazador de dipéptido comprende Val-Cit, Fe-Lis, Val-Ala, o Val-Lis. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador no escindible. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un grupo maleimido, que comprende opcionalmente maleimidocaproilo (mc), succinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), o sulfosuccinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC). En algunas realizaciones, el enlazador comprende, además, un separador. En algunas realizaciones, el separador comprende alcohol *p*-aminobenzilo (PAB), *p*-aminobenzioxicarbonilo (PABC), un derivado, o un análogo de los mismos. En algunas

realizaciones, el residuo conjugado es capaz de extender la vida media en suero, del conjugado IL-2. En algunas realizaciones, el residuo conjugado adicional, es capaz de extender la vida media en suero, del conjugado IL-2.

[0006] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un conjugado de interleucina 2 (IL-2) que comprende: un polipéptido IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado; en donde el conjugado IL-2 tiene una afinidad disminuida a una subunidad α (IL-2Rα) del receptor de IL-2, con respecto a un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones, el residuo conjugado está unido a un residuo de aminoácido que interactúa con IL-2Rα. En algunas realizaciones, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido seleccionado de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el residuo conjugado adicional comprende un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, cada uno de los polímeros solubles en agua comprenden, independientemente, polietileno glicol (PEG), poli(propileno glicol) (PPG), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico),

poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(hidroxialquil metacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, 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, PEG es 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 polisiálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, sulfato de heparán (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 conjugado 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 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 conjugado 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 un polímero similar a la proteína de la gelatina (GLK). 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 indirectamente al polipéptido IL-2 aislado y purificado a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador homobifuncional. En algunas realizaciones, el enlazador homobifuncional comprende el reactivo ditiobis (succinimidilpropionato) DSP de Lomant, '3'-ditiobis(sulfosuccinimidila proprionato) (DTSSP), suberato de disuccinimidila (DSS), bis(sulfosuccinimidila)suberato (BS), tartrato de disuccinimidila (DST), tartrato de disulfosuccinimidila (sulfo DST), etileno glicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de disuccinimidila (DSG), N,N'-disuccinimidila

carbonato (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridiloditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), compuesto que contiene haluro de arilo (DFDNB), tal como, por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno o 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), formaldehido, glutaraldehido, éter 1,4-butanediol diglicidilo, ácido adípico dihidrazida, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α'-p-diaminodifenil, ácido sulfónico diyodo-p-xileno, 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-succinimidila 3-(2-piridiloditio)propionato (sPDP), N-succinimidila 3-(2-piridiloditio)propionato de cadena larga (LC-sPDP), N-succinimidila 3-(2-piridiloditio) propionato de cadena larga soluble en agua (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonilo-α-metil-α-(2-piridiloditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidila-6-[α-metil-α-(2-piridiloditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-

carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster m-maleimidobenzoilo-N-hidroxisuccinimida (MBs), éster m-maleimidobenzoilo-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidila(4-yodoacetil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidila(4-yodoacetil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidila-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidila-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBs), éster N-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidila 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidila 6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidila 4-(((yodoacetil)amino)metilo)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidila 6-(((((4-yodoacetil)amino)metilo)ciclohexano-1-carbonil)amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenil yodoacetato (NPIA), reticuladores de carbonilo-reactivo y sulfhidrilo-reactivo, tales como, ácido butírico 4-(4-N-maleimidofenil) hidrazida (MPBH), 4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilo-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridiloditio)propionilo hidrazida (PDPH), ácido azidosalicílico N-hidroxisuccinimidila-4 (NHs-AsA), ácido azidosalicílico N-hidroxisulfosuccinimidila-4 (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidila-(4-

azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidila-2-(ρ-azidosalicilamido)etil-1,3′-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidila-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidila-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidila-6-(4′-azido-2′-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidila-6-(4′-azido-2′-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOs), sulfosuccinimidila-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3′-ditiopropionato (sAND), N-succinimidila-4(4-azidofenil)1,3′-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidila(4-azidofenil)-1,3′-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidila 4-(ρ-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidila 2-(7-azido-4-metilcoumarin-3-acetamida)etil-1,3′-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidila 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), ρ-nitrofenil diazopiruvato (ρNPDP), ρ-nitrofenilo-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(ρ-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(ρ-azidosalicilamido)butil]-3′-(2′-piridiloditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, ρ-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(ρ-azidosalicilamido)butilamina (AsBA), o ρ-azidofenil glioxal (APG). En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador escindible, que comprende opcionalmente un enlazador dipéptido. En algunas

realizaciones, el enlazador de dipéptido comprende Val-Cit, Fe-Lis, Val-Ala o Val-Lis. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador no escindible. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un grupo maleimida, que comprende opcionalmente maleimidocaproilo (mc), succinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), o sulfosuccinimidila-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC). En algunas realizaciones, el enlazador comprende, además, un separador. En algunas realizaciones, el separador comprende alcohol *p*-aminobenzilo (PAB), *p*-aminobenzioxicarbonilo (PABC), un derivado o análogo de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo conjugado es capaz de extender la vida media en suero, del conjugado IL-2. En algunas realizaciones, el residuo conjugado adicional es capaz de extender la vida media en suero, del conjugado IL-2.

[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 una posición en el polipéptido que reduce la unión entre el polipéptido IL-2 modificado y el receptor α (IL-2Rα) de interleucina 2, pero no perjudica significativamente la unión con el complejo de señalización del receptor (IL-2Rβγ) de interleucina 2 βγ para formar un complejo IL-2/IL-2Rβγ, en

donde la unión reducida a IL-2Rα se compara con una unión entre el polipéptido tipo salvaje IL-2 e IL-2Rα. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, P65, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 65, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, K64, V69, N71, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 64, 69, 71, 104, 105, y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural es seleccionado de T37, R38, T41, Y45, E61, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 45, 61, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de F42, K43,

F44, E62 y P65, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 42, 43, 44, 62 y 65 como se establece en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural: es un análogo de lisina; comprende una cadena lateral aromática; comprende un grupo azido; 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 aminoácido no natural comprende, N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, norborneno lisina, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonilisina, 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-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfoniotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonioserina, L-3-(2-naftil)alanina, ácido propanóico 2-amino-3-((2-((3-

(benziloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil), 2-amino-3-(fenilselanil)propanóico, o seleniocisteína. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora al polipéptido IL-2 modificado por medio de un par ortogonal de ARNt sintetasa/ARNt. En algunas realizaciones, el par ortogonal de ARNt sintetasa/ARNt, 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 conjugado comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende, polietileno glicol (PEG), poli(propileno glicol) (PPG), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolinas (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 PEG lineal. En algunas realizaciones, la molécula de PEG es 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, sulfato de heparán (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, la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, la proteína comprende un agonista de TLR. 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. 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 a al menos un aminoácido no natural de IL-2 modificado 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 combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de disminución en la afinidad de unión a IL-2Rα con respecto a un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la disminución de la afinidad de unión es de aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, o más en relación con IL-2Rα en relación con un polipéptido tipo salvaje IL-2. 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 eliminación de N-terminal, una eliminación C-terminal o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la supresión de la N-terminal comprende una supresión de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos del extremo N, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la eliminación C-terminal comprende una eliminación 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 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 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 disminución de la afinidad de unión a IL-2Rα es capaz de expandir células auxiliares CD4+, células efectoras e ingenuas CD8+ ingenuas, células asesinas

naturales (NK), poblaciones de células T asesinas naturales (NKT), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo conjugado deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2Rα. En algunas realizaciones, la activación de células auxiliares CD4+, células efectoras e ingenuas CD8+ y célula de memoria, células asesinas naturales (NK) o células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-2Rβγ por el polipéptido IL-2 modificado no es significativamente diferente que la activación de dicha población de células por un polipéptido IL-2 tipo salvaje, y en donde la potencia del polipéptido IL-2 modificado es al menos 1 veces mayor que la potencia del polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado expande las células T reguladoras CD4+ (Treg) en menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o 0.1% cuando dicho activador está en contacto con dicha población de células. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado no expande las células Treg en dicha población de células.

[0008] 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 en el polipéptido que reduce la unión entre el polipéptido IL-2 modificado y el receptor α (IL-2Rα) de interleucina 2, pero retiene una unión significativa con el

complejo de señalización del receptor βγ (IL-2Rβγ) de interleucina 2 para formar un complejo IL-2/IL-2Rβγ, en donde la unión reducida a IL-2Rα se compara con la unión entre un polipéptido tipo salvaje IL-2 e IL-2Rα. En algunas realizaciones, la diferencia en la potencia de señalización del receptor es inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces o inferior a 1 vez. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, P65, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 65, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, K64, V69, N71, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 64, 69, 71, 104, 105, y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la

posición del al menos un aminoácido no natural es seleccionado de T37, R38, T41, Y45, E61, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 45, 61, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de F42, K43, F44, E62 y P65, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 42, 43, 44, 62 y 65 como se establece en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural: es un análogo de lisina; 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 aminoácido no natural comprende, N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, norborneno lisina, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonilisina, 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-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina,

p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfoniotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonioserina, L-3-(2-naftil)alanina, ácido propanóico 2-amino-3-((2-((3-(benziloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil), 2-amino-3-(fenilselanil)propanóico, o seleniocisteína. 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 conjugado comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende polietileno glicol (PEG), poli(propileno glicol) (PPG), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-

hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolinas (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, sulfato de heparán (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, la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un agonista de TLR. 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. 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 a al menos un aminoácido no natural de IL-2 modificado 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 combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es de aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de disminución en la afinidad de unión con respecto a IL-2Rα a un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones,

la disminución de la afinidad de unión es de aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más, con respecto a IL-2Rα, en un polipéptido IL-2 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 eliminación de N-terminal, una eliminación C-terminal o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la supresión de la N-terminal comprende una supresión de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos del extremo N, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la eliminación de C-terminal comprende una eliminación 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 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 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 disminución de la afinidad de unión a IL-2Rα es capaz de expandir las células auxiliares CD4+, el efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, las células asesinas naturales (NK), las células T asesinas naturales (NKT) o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo conjugado o el aminoácido no natural deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2Rα. En algunas realizaciones, la activación de la célula auxiliar CD4+, el efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, las células asesinas naturales (NK) o las células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-2Rβγ por el polipéptido IL-2 modificado, retiene una potencia significativa de activación de dicha población de células en relación con un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado al complejo IL-2Rβγ es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje, al complejo IL-2Rβγ. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado, con respecto al complejo IL-2Rβγ es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2

tipo salvaje, con respecto al complejo IL-2Rβγ. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor para IL-2Rβγ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2Rαβγ, y 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, o superior a la potencia de señalización del segundo receptor. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rβγ, y la potencia de señalización del segundo receptor de IL-2 modificado el polipéptido es más bajo que una potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rαβγ. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es al menos 1 veces menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje.

[0009] 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 donde el polipéptido IL-2 aislado y modificado exhibe una

potencia de señalización del primer receptor a un complejo de señalización de IL-2βγ, y una potencia de señalización del segundo receptor a un complejo de señalización de IL-2αβγ, y en donde la diferencia entre la potencia de señalización del primer receptor y la potencia de señalización del segundo receptor es inferior a 10 veces. En algunas realizaciones, la diferencia en la potencia de señalización del receptor es inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces o inferior a 1 vez. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, P65, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 65, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, K64, V69, N71, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 64, 69, 71, 104,

105, y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de T37, R38, T41, Y45, E61, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 45, 61, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de F42, K43, F44, E62 y P65, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 42, 43, 44, 62 y 65 como se establece en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural: es un análogo de lisina; 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 aminoácido no natural comprende, N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, norborneno lisina, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonilisina, 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-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-

fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfoniotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonioserina, L-3-(2-naftil)alanina, ácido propanóico 2-amino-3-((2-((3-(benziloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil), 2-amino-3-(fenilselanil)propanóico, o seleniocisteína. 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 conjugado comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende, polietileno glicol (PEG), poli(propileno glicol) (PPG), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida),

poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolinas (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, sulfato de heparán (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, la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un agonista de TLR. 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. 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 a al menos un aminoácido no natural de IL-2 modificado 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 combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es de aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de disminución en la afinidad de unión con respecto a IL-2Rα a

un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones, la disminución de la afinidad de unión es de aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más, con respecto a IL-2Rα, en un polipéptido IL-2 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 eliminación de N-terminal, una eliminación C-terminal o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la supresión de la N-terminal comprende una supresión de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos del extremo N, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la eliminación C-terminal comprende una eliminación 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 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 la 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 disminución de la afinidad de unión a IL-2Rα es capaz de expandir la célula auxiliar CD4+, células efectoras e ingenuas CD8+ ingenuas, células asesinas naturales (NK), poblaciones de células T asesinas naturales (NKT), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo conjugado o el aminoácido no natural deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2Rα. En algunas realizaciones, la activación de la célula auxiliar CD4+, el efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, las células asesinas naturales (NK) o las células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-2Rβγ por el polipéptido IL-2 modificado retiene una potencia significativa de activación de dicha población de células en relación con un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado al complejo IL-2Rβγ es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje, al complejo IL-2Rβγ. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado, con respecto al

complejo IL-2Rβγ es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje, con respecto al complejo IL-2Rβγ. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor para IL-2Rβγ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2Rαβγ, y 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, o superior a la potencia de señalización del segundo receptor. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rβγ, y la potencia de señalización del segundo receptor de IL-2 modificado el polipéptido es más bajo que una potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rαβγ. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es al menos 1 veces menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje.

[0010] 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 donde el polipéptido IL-2 aislado y modificado proporciona un primer valor de EC50 para activar el complejo de señalización de IL-2βγ y un segundo valor de EC50 para activar el complejo de señalización de IL-2αβγ, y en donde la diferencia entre el primer valor de EC50 y el segundo valor de EC50 es inferior a 10 veces. En algunas realizaciones, la diferencia es inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces o inferior a 1 vez. En algunas realizaciones, la diferencia en la potencia de señalización del receptor es inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces o inferior a 1 vez. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, P65, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 65, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no

natural se selecciona de K35, K64, V69, N71, M104, C105 e Y107, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 35, 64, 69, 71, 104, 105, y 107 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de T37, R38, T41, Y45, E61, E68 y L72, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 37, 38, 41, 45, 61, 68 y 72 como se establece en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona de F42, K43, F44, E62 y P65, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones 42, 43, 44, 62 y 65 como se establece en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural: es un análogo de lisina; 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 aminoácido no natural comprende, N6-azidoetoxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, norborneno lisina, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonilisina, 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-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfoniotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonioserina, L-3-(2-naftil)alanina, ácido propanóico 2-amino-3-((2-((3-(benziloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil), 2-amino-3-(fenilselanil)propanóico, o seleniocisteína. 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 conjugado comprende un polímero soluble en agua, un lípido, una proteína o un péptido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende, polietileno glicol (PEG), poli(propileno glicol) (PPG), copolímeros de etileno glicol y

propileno glicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolinas (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, sulfato de heparán (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, la proteína comprende una albúmina, una transferrina o una transtiretina. En algunas realizaciones, el residuo conjugado comprende un agonista de TLR. 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. 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 a al menos un aminoácido no natural de IL-2 modificado 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 combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la

disminución en la afinidad de unión es de aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de disminución en la afinidad de unión con respecto a IL-2Rα a un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones, la disminución de la afinidad de unión es de aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más, con respecto a IL-2Rα, en un polipéptido IL-2 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 eliminación de N-terminal, una eliminación C-terminal o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la supresión de la N-terminal comprende una supresión de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 residuos del extremo N, en donde las posiciones de los residuos son en referencia a las posiciones en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la eliminación C-terminal comprende una eliminación 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 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 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 disminución de la afinidad de unión a IL-2Rα es capaz de expandir células auxiliares CD4+, células efectoras e ingenuas CD8+ ingenuas, células asesinas naturales (NK), poblaciones de células T asesinas naturales (NKT), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el residuo conjugado o el aminoácido no natural deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2Rα. En algunas realizaciones, la activación de la célula auxiliar CD4+, el efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, las células asesinas naturales (NK) o las células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-2Rβγ por el polipéptido IL-2 modificado retiene una potencia significativa de activación de dicha población de células en relación con un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado al complejo IL-2Rβγ es mayor que la potencia de señalización del

receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje, al complejo IL-2Rβγ. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado, con respecto al complejo IL-2Rβγ es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje, con respecto al complejo IL-2Rβγ. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor para IL-2Rβγ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2Rαβγ, y 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, o superior a la potencia de señalización del segundo receptor. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rβγ, y la potencia de señalización del segundo receptor de IL-2 modificado el polipéptido es más bajo que una potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rαβγ. En algunas realizaciones, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es al menos 1 veces menor que la potencia de señalización del receptor del

polipéptido IL-2 tipo salvaje.

[0011] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe una composición farmacéutica que comprende: un conjugado de IL-2 descrito anteriormente; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración parenteral.

[0012] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un método para tratar una enfermedad o afección proliferativa en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido IL-2 aislado y modificado descrito anteriormente, una IL-2 conjugado descrito anteriormente, una proteína de unión a IL-2Rβγ descrita anteriormente, un activador de una célula auxiliar CD4+, una célula efectora y memoria efectora CD8+, una célula asesina natural (NK) o una células T asesinas naturales (NKT), descrita anteriormente, o una composición farmacéutica descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección proliferativa es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de tumor sólido. En algunas realizaciones, el cáncer de tumor sólido es cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ojos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de

riñón, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor maligno hematológico. En algunas realizaciones, la neoplasia maligna hematológica es leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinamia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma no Burkitt de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor B, célula B leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario o granulomatosis linfomatoide. En algunas realizaciones, el método comprende, además, administrar un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado, el conjugado de IL-2, la proteína de unión a IL-2Rβγ, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria,

una célula asesina natural (NK) o natural la célula T asesina (NKT), o la composición farmacéutica y el agente terapéutico adicional, se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado, el conjugado de IL-2, la proteína de unión a IL-2Rβγ, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK) o natural la célula T asesina (NKT), o la composición farmacéutica y el agente terapéutico adicional, se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado, el conjugado de IL-2, la proteína de unión a IL-2Rβγ, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK) o natural la célula T asesina (NKT), o la composición farmacéutica, se administra antes del agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado, el conjugado de IL-2, la proteína de unión a IL-2Rβγ, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK) o célula T asesina natural (NKT), o la composición farmacéutica, se administra después de la administración del agente terapéutico adicional.

[0013] En el presente documento, en ciertas realizaciones, se describe un método para expandir una célula

auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK) o una célula T asesina natural (NKT), que comprende: poner en contacto una población de células con un polipéptido IL-2 aislado y modificado descrito anteriormente, un conjugado de IL-2 descrito anteriormente, una proteína de unión a IL-2Rβγ descrita anteriormente, un activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK), o una célula T asesina natural (NKT), descrita anteriormente, o una composición farmacéutica descrita anteriormente, durante un tiempo suficiente para inducir la formación de un complejo con un IL-2Rβγ, estimulando así la expansión de la población de células Teff o NK. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado descrito anteriormente, el conjugado IL-2 descrito anteriormente, la proteína de unión a IL-2Rβγ descrita anteriormente, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector CD8+ ingenuo y una célula de memoria, una célula asesina natural (NK), o una célula T asesina natural (NKT), descrita anteriormente, o la composición farmacéutica, descrita anteriormente, expande las células T reguladoras CD4+ (Treg) en menos del 20%, 15%, 10%, 5% o 1% en la población de células CD3+ en comparación con una expansión de células Treg CD4+ en la población de células CD3+ en contacto

con un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 aislado y modificado descrito anteriormente, el conjugado IL-2 descrito anteriormente, la proteína de unión a IL-2Rβγ descrita anteriormente, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector CD8+ ingenuo y una célula de memoria, una célula asesina natural (NK), o una célula T asesina natural (NKT), descrita anteriormente, o la composición farmacéutica, descrita anteriormente, no expande las células Treg CD4+ en la población de células. En algunas realizaciones, la relación de células Teff con las células Treg en la población de células, después de la incubación con el polipéptido IL-2 aislado y modificado descrito anteriormente, el conjugado IL-2 descrito anteriormente, la proteína de unión a IL-2Rβγ descrita anteriormente, el activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK) o una células T asesinas naturales (NKT), descrita anteriormente, o la composición farmacéutica, descrita anteriormente, es aproximadamente o al menos 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 50: 1 o 100: 1. En algunas realizaciones, el método es un método in vivo. En algunas realizaciones, el método es un método in vitro. En algunas realizaciones, el método es un método ex vivo.

[0014] En el presente documento, en ciertas

realizaciones, se describe un método para expandir una población de células auxiliares CD4+, una población de células efectoras CD8+, una población de células asesinas naturales (NK), una población de células T asesinas naturales (NKT), o una combinación de los mismos, que comprende: (a) poner en contacto una célula con un conjugado de IL-2 descrito anteriormente; y (b) interacción de IL-2 con las subunidades IL-2Rβ e IL-2Rγ para formar un complejo IL-2/IL-2Rβγ; en donde el conjugado IL-2 tiene una afinidad disminuida a la subunidad IL-2Rα, y en donde el complejo IL-2/IL-2Rβγ estimula la expansión de células auxiliares CD4+, células efectoras ingenuas CD8+, células NK, células NKT, o una combinación de los mismos.

[0015] En este documento, en ciertas realizaciones, se describe un kit que comprende un polipéptido IL-2 aislado y modificado descrito anteriormente, un conjugado de IL-2 descrito anteriormente, una proteína de unión a IL-2Rβγ descrita anteriormente, un activador de una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula asesina natural (NK) o células T asesinas naturales (NKT), descritas 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 codifica un polipéptido IL-2 descrito anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0016] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y 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 las Figuras adjuntas de las cuales:

[0017] Figura 1 — Muestra ejemplos de aminoácidos no naturales. Esta Figura está adaptada de la Figura 2 de Young ***et al.***, "Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon," [Más allá de los 20 aminoácidos canónicos: expandiendo el léxico genético], ***J. de Biological Chemistry*** 285(15): 11039-11044 (2010).

[0018] Figuras 2A a 2B — Ilustran ejemplos de aminoácidos no naturales. La

Figura 2A ilustra derivados de lisina ejemplares. La Figura 2B ilustra derivados de fenilalanina ejemplares.

[0019] Figuras 3A a 3D Ilustran ejemplos de aminoácidos no naturales. Estos aminoácidos no naturales (UA) se han codificado genéticamente en proteínas (Figura 3A-UA #1-42; Figura 3B-UA #43-89; Figura 3C-UA #90-128; Figura 3D-UA #129-167). Figuras 5A-5D se adoptaron de la Tabla 1 de Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69.

[0020] Figuras 4A a 4B Muestran análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de conjugados P65_30kD, P65_5kD, E62_30kD y E62_5kD PEG. La Figura 4A muestra el análisis SPR de las variantes de IL-2 que se unen a IL-2 Rα

inmovilizada. La Figura 4B muestra el análisis SPR de las variantes de IL-2 que se unen a IL-2 Rβ inmovilizada.

[0021] Figuras 5A a 5C — Muestran curvas de respuesta de dosis variantes de IL-2 ejemplares para la señalización de pSTAT5 en poblaciones de células primarias LRS humanas. Figura 5A: IL-2 nativa; Figura 5B: E62_30kD; y Figura 5C: P65_30kD.

[0022] Figura 6 — Muestra la concentración plasmática media (±DE) frente a los perfiles de tiempo después de una dosis intravenosa única de aldesleucina (IL-2), E62_5, E62_30 y P65_30 a ratones C57BL/6.

[0023] Figura 7 — Muestra el porcentaje de células T pSTAT5+ CD8+ frente a las células del tiempo en

sangre periférica después del tratamiento con una dosis única de bolo IV de P65_30 o aldesleucina a ratones C57BL/6.

[0024] Figuras 8A a 8C Muestran el porcentaje de células T CD8+ (Figura 8A), células NK (Figura 8B) y células Treg CD4+ (Figura 8C) en la población de PBMC después del tratamiento con una sola dosis de bolo IV. de P65_30 o Aldesleucina (IL-2). Se extrajo sangre mediante punción cardíaca en los puntos de tiempo indicados y las poblaciones de células inmunes se evaluaron mediante citometría de flujo. Cada punto de datos representa un promedio de 3 réplicas en cada punto de tiempo, ±SEM.

[0025] Figuras 9A a 9B Muestran diferencias entre P65_30 e IL-2 (Aldesleucina)

en la estimulación de la proliferación de células T CD8+CD44+ en la memoria dentro de la población CD3+ después del tratamiento con una dosis única en bolo IV de P65_30 o Aldesleucina (IL-2). Se extrajo sangre mediante punción cardíaca en los puntos de tiempo indicados y las poblaciones de células inmunes se evaluaron mediante citometría de flujo. Los datos se analizaron usando la prueba Student t no apareada. *** valores designados de P <0.001. La Figura 9A muestra la proliferación de células T CD8+CD44+ en la memoria a las 72, 96 y 120 horas. La Figura 9B muestra el análisis de citometría de flujo de esas células en el punto de tiempo de 120 h.

[0026] Figura 10

Muestra el aumento de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) frente al tiempo en ratones C57Bl6 que portan tumores singénicos B16F10 después del tratamiento con una dosis única de bolo IV de P65_30. La Figura 10A muestra el porcentaje de NK, células Treg CD8+ T y CD4+, en animales tratados con P65_30 frente a animales no tratados (vehículo) en el día 5 de tratamiento. La Figura 10B muestra la relación de células Treg CD8+/CD4+ en animales tratados con P65_30 y control (vehículo). Los datos se analizaron usando la prueba Student t no apareada. *** valores designados de P <0.001.

[0027] Figura 11A a 11B

Muestra los niveles plasmáticos de IL-2, TNF-α,

IFNγ, IL-5 e IL-6 en ratones después del tratamiento con una dosis única en bolo IV de P65_30 o Aldesleucina (IL-2) a niveles crecientes (0.01-5 mg/kg). La concentración de cada citocina en plasma se determinó mediante ELISA (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Para cada grupo de dosis, se recogieron N= 3 ratones y muestras a las 4, 34 y 72 h después de la dosis. La Figura 11A muestra los niveles de citocinas para los animales con dosis de Aldesleucina y la Figura 11B para los animales con dosis de P65_30.

[0028] Figura 12 Muestra los recuentos de glóbulos blancos, linfocitos y eosinófilos (media ±DE) después de una dosis IV única de P65_30kD a monos

Cynomolgus machos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0029] 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. En algunos casos, las citocinas modulan el equilibrio entre las respuestas inmunes humorales y celulares.

[0030] 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.

[0031] La interleucina 2 (IL-2) es una citocina pleiotrópica tipo 1 cuya estructura comprende un haz de cuatro hélices α 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 resultando en 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 asesinas naturales (NK) y las células T asesinas naturales (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-2Rα (también conocido como CD25), IL-2Rβ (también conocido como CD122) e IL-2Rγ (también conocido como CD132). La interacción de IL-2 con IL-2Rα forma la "afinidad baja" del complejo receptor IL-2 con un K_d de apróximadamente 10^{-8} M. Una interacción de IL-2 con IL-2Rβ y IL-2Rγ forma la "afinidad intermedia" el complejo receptor IL-2 con un K_d de apróximadamente 10^{-9} M. Una interacción de IL-2 con todas las tres subunidades, IL-2Rα, IL-2Rβ, y IL-2Rγ, forma la “afinidad alta” del complejo receptor IL-2 con un K_d de apróximadamente $>10^{-11}$ M.

[0032] En algunos casos, IL-2 señalizado mediante la ““afinidad alta”” del complejo receptor IL-2Rαβγ modula la activación y proliferación de las células T reguladoras. Las células T reguladoras, o $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ células T reguladoras (Treg), median el mantenimiento de la homeostasis inmune,

mediante la supresión de células efectoras como las células T CD4+, células T CD8+, células B, células NK, y células NKT. En algunos casos, las células Treg se generan a partir del timus (células tTreg) o son inducidos por células T ingenuas en las células periféricas (células pTreg). En algunos casos, Las células Treg se consideran la mediadora de la tolerancia periférica. De hecho, en un estudio, la transferencia de Células TCD4+ periféricas reducidas a CD25, produjo una variedad de enfermedades autoinmunes en ratones al natural, mientras que cotransferir las células T $CD4^{+}CD25^{+}$, suprime 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 expresan cadenas alfa del receptor de IL-2 (CD25)] ***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.

[0033] La señalización de IL-2 a través del complejo IL-2Rβγ de "afinidad intermedia" modula la activación y proliferación de las células efectoras $CD8^{+}$ T (Teff), células NK y células NKT. Las células Teff $CD8^{+}$ (también conocidas como células T citotóxicas, células Tc, linfocitos T

citotóxicos, CTL, células T-asesinas, células T citolíticas, Tcon o células T asesinas) son linfocitos T que reconocen y destruyen las células dañadas, las células cancerosas y células infectadas con patógenos. Las células NK y NKT son tipos de linfocitos que, de forma similar a las células Teff $CD8^+$, se dirigen a las células cancerosas y a las células infectadas por patógenos.

[0034] En algunos casos, la señalización de IL-2 se utiliza para modular las respuestas de células T y, posteriormente, para el tratamiento de un cáncer. Por ejemplo, IL-2 se administra en una forma de dosis alta para inducir la expansión de las poblaciones de células Teff para el tratamiento de un cáncer. Sin embargo, la dosis alta de IL2 conduce además a la estimulación concomitante de las células Treg que amortiguan las respuestas inmunitarias antitumorales. Las dosis altas de IL-2 también inducen eventos adversos tóxicos mediados por el compromiso de las células que expresan la cadena alfa de IL-2R en la vasculatura, incluidas las células inmunes innatas tipo 2 (ILC-2), los eosinófilos y las células endoteliales. Esto conduce a eosinofilia, fuga capilar y síndrome de fuga vascular (VLS).

[0035] En el presente documento, en ciertas realizaciones, se describe un método para regular

selectivamente las poblaciones distintas de linfocitos (por ejemplo, células auxiliares CD4+, células efectoras e inmunitarias CD8+, células NK o células NKT) a través de la señalización de receptores de citocinas/citocinas. En algunos casos, la citocina comprende una interleucina, un interferón o un factor de necrosis tumoral. 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.

[0036] En algunas realizaciones, también se describe en el presente documento un método de regulación selectiva positiva de células auxiliares CD4+, células efectoras CD8+ y célula de memoria, células NK o células NKT mediante señalización de IL-2/IL-2R. En algunos casos, IL-2 es un conjugado de IL-2, que interactúa con el complejo IL-2Rβγ de "afinidad intermedia", opcionalmente con una potencia similar al complejo IL-2Rαβγ, y con una interacción IL-2Rα debilitada en relación con tipo salvaje IL-2. En algunas realizaciones, se describen adicionalmente en el presente documento métodos para tratar un cáncer con el uso de un conjugado de IL-2 descrito en el presente 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

[0037] 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, una linfoquina o un factor de crecimiento. 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. En otros casos, la citocina es un factor de crecimiento.

[0038] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento, un conjugado de interleucina. Las interleucinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, interleucina 1β (IL-1β), 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-1β, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21.

Conjugados de IL-2

[0039] En algunas realizaciones, se describen en el presente documento conjugados de IL-2 modificados en una posición de aminoácidos. En algunos casos, la modificación es a un aminoácido natural. En algunos casos, la modificación es a un aminoácido no natural. En algunos casos, aquí se describe un polipéptido IL-2 aislado y modificado que comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, el polipéptido IL-2 es una IL-2 de mamífero aislada y purificada, 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 El 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.

[0040] En algunos casos, el polipéptido IL-2 es una

variante truncada. En algunos casos, el truncamiento es una eliminación de N-terminal. En otros casos, el truncamiento es una eliminación de C-terminal. En casos adicionales, el truncamiento comprende las eliminaciones de la N-terminal y la C-terminal. Por ejemplo, el truncamiento puede ser una eliminación 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 eliminación 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 eliminación 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 eliminación de N-terminal de al menos o aproximadamente 2 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una eliminación de N-terminal de al menos o aproximadamente 3 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una eliminación de N-terminal de al menos o aproximadamente 4 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una eliminación de N-terminal de al menos o aproximadamente 5 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-2 comprende una eliminación de N-terminal de al menos o aproximadamente 6 residuos. En algunos casos, el polipéptido

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

[0041] 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, 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 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 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 1-130, 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.

[0042] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un conjugado de IL-2 que comprende un polipéptido IL-2 aislado, purificado y modificado y un residuo conjugado. En algunos casos, el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida a una subunidad α del receptor de IL-2 (IL-2Rα) con respecto a un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que interactúa con IL-2Rα (por ejemplo, en la interfaz IL-2/IL-2Rα). En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que está próximo a la interfaz IL-2/IL-2Rα (por ejemplo, aproximadamente 5 Å, aproximadamente 10 Å, aproximadamente 15 Å o aproximadamente

20 Å lejos de la interfaz IL-2/IL-2Rα). Como se usa en el presente documento, los residuos implicados en la interfaz IL-2/IL-2Rα comprenden residuos IL-2 que forman interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas con residuos de la subunidad IL-2Rα.

[0043] En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido seleccionado de una posición de aminoácido Y31, K32, N33, P34, K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, P47, K48, Q57, E60, E61, E62, L63, K64, P65, E68, V69, N71, L72, Q74, S75, K76, N77, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111 o A112, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de Y31, K32, N33, P34, K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, P47, K48, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72, Q74, S75, K76, N77, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111 y A112. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de N33, P34, K35, T37, R38, M39, T41, F42, K43, F44, Y45, Q57, E60, E61, E62, L63, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111 y A112. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45,

E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre T37, T41, F42, F44, Y45, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de R38 y K64. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de E61, E62 y E68. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K35. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T37. En algunos casos, la posición del aminoácido está en R38. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T41. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en F42. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K43. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en F44. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en Y45. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en E61. En algunos casos, la posición del aminoácido está en E62. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K64. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en E68. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en P65. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en V69. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L72. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en Y107. En algunos casos, la posición

de los aminoácidos está en L72. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en D109.

[0044] En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende, además, una mutación adicional. En algunos casos, la mutación adicional está en una posición de aminoácidos seleccionada entre K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En tales casos, el aminoácido se conjuga con un residuo conjugado 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 conjugado adicional.

[0045] En algunas realizaciones, la afinidad disminuida del polipéptido IL-2 modificado a una subunidad α (IL-2Rα) del receptor de IL-2 en relación con un polipéptido IL-2 tipo salvaje sin la modificación de aminoácidos no natural (por ejemplo, un polipéptido IL-2 tipo salvaje) es aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%, o mayor que 99%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de aproximadamente el 10%. En algunos casos, la disminución de la afinidad es de 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 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 disminución de la afinidad es de aproximadamente el 80%. En algunos casos, la afinidad disminuida es de aproximadamente el 100%.

[0046] En algunas realizaciones, la afinidad disminuida del polipéptido IL-2 modificado a una subunidad α del receptor de IL-2 (IL-2Rα) con respecto a un polipéptido IL-2 equivalente sin la modificación de aminoácidos no naturales (por ejemplo, un polipéptido tipo IL-2) 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 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 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 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 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.

[0047] En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado no interactúa con IL-2Rα. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado se conjuga adicionalmente con un residuo conjugado. En algunos casos, el conjugado de IL-2 no interactúa con IL-2Rα.

[0048] En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una primera potencia de señalización del receptor a un complejo de señalización de IL-2βγ y una segunda potencia de señalización del receptor a un complejo de señalización de IL-2αβγ, y en donde hay una diferencia

entre la potencia de señalización del primer receptor y la potencia de señalización del segundo receptor es inferior a 10 veces. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor a un complejo de señalización de IL-2βγ y una potencia de señalización del segundo receptor a un complejo de señalización de IL-2αβγ, y en donde hay una diferencia entre la potencia de señalización del primer receptor y la segunda la potencia de señalización del receptor es inferior a 5 veces. En algunos casos, la diferencia es menos de 9 veces, menos de 8 veces, menos de 7 veces, menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces, menos de 2 veces o menos de 1 vez. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado es un agonista parcial, por ejemplo, un agonista que activa un receptor (por ejemplo, un complejo de señalización de IL-2βγ o un complejo de señalización de IL-2αβγ) pero solo tiene una eficacia parcial en el receptor relativo a un agonista completo. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado es un agonista completo, por ejemplo, un agonista que activa un receptor (por ejemplo, un complejo de señalización de IL-2βγ o un complejo de señalización de IL-2αβγ) con una respuesta máxima.

[0049] En algunos casos, la potencia de señalización del receptor se mide por un valor de CE50. En algunos casos, el

polipéptido IL-2 modificado proporciona un primer valor EC50 para activar el complejo de señalización IL-2βγ y un segundo valor EC50 para activar el complejo de señalización IL-2αβγ, y en donde la diferencia entre el primer valor EC50 y el segundo valor EC50 es menor de 10 veces. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado proporciona un primer valor EC50 para activar el complejo de señalización IL-2βγ y un segundo valor EC50 para activar el complejo de señalización IL-2αβγ, y en donde la diferencia entre el primer valor EC50 y el segundo valor EC50 es menor de 5 veces. En algunos casos, la diferencia es menos de 9 veces, menos de 8 veces, menos de 7 veces, menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces, menos de 2 veces o menos de 1 vez.

[0050] En algunos casos, la potencia de señalización del receptor se mide por un valor ED50. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado proporciona un primer valor ED50 para activar el complejo de señalización IL-2βγ y un segundo valor ED50 para activar el complejo de señalización IL-2αβγ, y en donde la diferencia entre el primer valor ED50 y el segundo valor ED50 es menor de 10 veces. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado proporciona un primer valor ED50 para activar el complejo de señalización IL-2βγ y un segundo valor ED50 para activar el complejo de señalización IL-2αβγ, y en donde la diferencia entre el primer valor ED50 y el

segundo valor ED50 es menor de 5 veces. En algunos casos, la diferencia es menos de 9 veces, menos de 8 veces, menos de 7 veces, menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces, menos de 2 veces o menos de 1 vez.

[0051] En algunas realizaciones, el residuo conjugado está unido a la N-terminal o a la 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 el extremo N o el 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.

[0052] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 con afinidad de unión reducida a IL-2Rα es capaz de expandir las células auxiliares CD4+, el efector CD8+ y las células T de memoria, células asesinas naturales (NK) o células T asesinas naturales (NKT) poblaciones celulares. En algunos casos, el residuo conjugado deteriora o bloquea la unión de IL-2 con IL-2Rα.

[0053] En algunos casos, la activación de la célula auxiliar CD4+, el efector CD8+ y célula de memoria, las células asesinas naturales (NK) o las células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-2Rβγ por el polipéptido IL-2 modificado retiene potencia significativa de activación de dicha población de células en relación con un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunos casos, la activación por el polipéptido IL-2 modificado es equivalente a la del polipéptido IL-2 tipo salvaje. En otros casos, la activación por el polipéptido IL-2 modificado es mayor que la del polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunos casos, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado al complejo IL-2Rβγ es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje, al complejo IL-2Rβγ. En algunos casos, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado es al menos 1 veces mayor que la potencia respectiva del polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunos casos, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado es aproximadamente o al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 hojas, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1,000 veces o más

que la potencia respectiva del polipéptido IL-2 tipo salvaje. En tales casos, la dosis o concentración del polipéptido IL-2 modificado utilizado para lograr un nivel similar de activación de la célula auxiliar CD4+, el efector CD8+ y célula de memoria, las células asesinas naturales (NK) o las células T asesinas naturales (NKT) La población de células como un polipéptido IL-2 tipo salvaje es menor que una dosis o concentración utilizada para el polipéptido IL-2 tipo salvaje.

[0054] En algunas realizaciones, la activación de la célula auxiliar CD4+, el efector CD8+ y célula de memoria, la célula asesina natural (NK) o la población de células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-2Rβγ por el polipéptido IL-2 modificado retiene potencia significativa de activación de dicha población de células por un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunos casos, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado del complejo IL-2Rβγ es menor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje del complejo IL-2Rβγ. En algunos casos, la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 modificado es aproximadamente o al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o 50 veces más bajo que la potencia respectiva del polipéptido IL-2 tipo salvaje.

[0055] En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor para IL-2Rβγ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2Rαβγ. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor para IL-2Rβγ es una potencia mejorada en relación con un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunos casos, la potencia de señalización del segundo receptor para IL-2Rαβγ es una potencia deteriorada en relación con el polipéptido IL-2 tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-2 modificado exhibe una potencia de señalización del primer receptor para IL-2Rβγ y una potencia de señalización del segundo receptor para IL-2Raβγ, y 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 más que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 1 veces o mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 2 veces mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 5 veces mayor que la potencia de

señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 10 veces mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 20 veces mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor está en al menos 50 veces o más que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 100 veces mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 500 veces o mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor es al menos 1000 veces mayor que la potencia de señalización del segundo receptor. En algunos casos, la potencia de señalización del primer receptor del polipéptido IL-2 modificado es mayor que la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rβγ, y la potencia de señalización del segundo receptor de IL-2 modificado el polipéptido es más bajo que una potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-2 tipo salvaje al IL-2Rαβγ. En algunos casos, ambas potencias de señalización del receptor son más bajas que sus potencias

respectivas en un polipéptido IL-2 tipo salvaje. En otros casos, ambas potencias de señalización del receptor son más altas que sus potencias respectivas en un polipéptido IL-2 tipo salvaje.

[0056] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 disminuye un evento adverso tóxico en un sujeto administrado con el conjugado de IL-2. Ejemplos de eventos adversos tóxicos incluyen eosinofilia, fuga capilar y síndrome de fuga vascular (VLS). En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la ocurrencia de un evento adverso tóxico en el sujeto en aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina. En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la gravedad de un evento adverso tóxico en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina.

[0057] En algunos casos, el evento adverso tóxico es la eosinofilia. En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la aparición de eosinofilia en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto

administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina. En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la gravedad de la eosinofilia en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina.

[0058] En algunos casos, el evento adverso tóxico es la fuga capilar. En algunos casos, el conjugado IL-2 disminuye la ocurrencia de fuga capilar en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina. En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la gravedad de la fuga capilar en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina.

[0059] En algunos casos, el evento adverso tóxico es VLS. En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la aparición de VLS en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina. En algunos casos, el conjugado de IL-2 disminuye la gravedad de

VLS en el sujeto en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o aproximadamente 100%, en relación con un segundo sujeto administrado con una IL-2 tipo salvaje o Aldesleucina.

[0060] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática 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 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

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 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 vida media plasmática de más de 24 horas.

[0061] 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, 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

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 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 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.

[0062] 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

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 aproximadamente 3 días.

[0063] 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 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 unas 10 horas.

[0064] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2

comprende una vida media en plasma que es capaz de proliferar o expandir una célula auxiliar CD4+, un efector CD8+ y células T de memoria, células NK, células NKT o una combinación de los mismos., pero no ejerce un efecto nocivo como la apoptosis.

[0065] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada, por ejemplo, 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 tipo salvaje. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada, por ejemplo, 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 relación con una IL-2 tipo salvaje.

[0066] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una semivida 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 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 en relación con una IL-2 tipo salvaje.

[0067] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada, por ejemplo, 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 la aldesleucina. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada, por ejemplo, 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 relación con la aldesleucina.

[0068] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una semivida 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 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 en relación con la aldesleucina.

[0069] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una vida media plasmática prolongada 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, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más 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 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 tipo salvaje.

[0070] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 comprende una semivida plasmática prolongada 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, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más 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 la aldesleucina. 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 la Aldesleucina.

[0071] 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 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 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 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 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. En algunos casos, el tamaño del residuo conjugado reduce la potencia en menos del 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en relación con la aldesleucina.

[0072] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2

comprende un residuo conjugado en donde el tamaño (por ejemplo, la columna 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 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 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 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. En 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 la Aldesleucina.

[0073] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un conjugado de IL-2 que comprende un aminoácido no natural unido covalentemente a un residuo conjugado, en donde el aminoácido no natural se encuentra en la región 35-107, y en donde la región 35-107 corresponde a residuos K35-Y107 de SEQ ID NO: 1.

[0074] En algunas realizaciones, aquí se describe una proteína de unión al receptor βγ (IL-2Rβγ) de interleucina 2, en donde la afinidad de unión por un receptor de interleucina 2 α (IL-2Rα) de dicha proteína de unión es menor que la de tipo salvaje IL-2 humana (hIL-2), en donde la afinidad de unión por un receptor de interleucina 2 α (IL-2Rα) de dicha proteína de unión es menor que la de IL-2 humana tipo salvaje (hIL-2). En algunas realizaciones, aquí se describe una proteína de unión al receptor βγ (IL-2Rβγ) de interleucina 2, en donde la afinidad de unión por un receptor de interleucina 2 α (IL-2Rα) de dicha proteína de unión es menor que la de

IL-2 (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 activo del mismo, en donde el polipéptido IL-2 modificado comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra en la región 35-107, y en donde la región 35-107 corresponde a los residuos K35-Y107 de la SEQ ID NO: 1.

[0075] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un complejo IL-2/IL-2Rβγ que comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende una mutación y un IL-2Rβγ, en donde el polipéptido IL-2 modificado tiene una afinidad de unión reducida hacia IL-2Rα, y en donde la afinidad de unión reducida se compara con una afinidad de unión entre un polipéptido IL-2 tipo salvaje e IL-2Rα. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado comprende, además, un residuo conjugado unido covalentemente al sitio de mutación. En algunos casos, el sitio de mutación comprende un aminoácido mutado a un aminoácido natural. En algunos casos, el sitio de mutación comprende un aminoácido mutado a un residuo de cisteína. En otros casos, el sitio de mutación comprende un aminoácido mutado a un residuo de lisina.

[0076] En algunas realizaciones, se describe en el

presente documento un complejo IL-2/IL-2Rβγ que comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende un aminoácido no natural y un IL-2Rβγ, en donde el polipéptido IL-2 modificado tiene una afinidad de unión reducida hacia IL-2Rα, y en donde la afinidad de unión reducida se compara con una afinidad de unión entre un polipéptido IL-2 tipo salvaje e IL-2Rα. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado comprende, además, un residuo conjugado unido covalentemente al aminoácido no natural.

[0077] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un complejo IL-2/IL-2Rβγ que comprende un polipéptido IL-2 modificado que comprende un aminoácido no natural y un IL-2Rβγ, en donde el polipéptido IL-2 modificado tiene una potencia de señalización de receptor reducida hacia IL-2Rα, y en donde la potencia de señalización del receptor reducida se compara con una potencia de señalización del receptor entre un polipéptido IL-2 tipo salvaje e IL-2Rα. En algunos casos, el polipéptido IL-2 modificado comprende, además, un residuo conjugado unido covalentemente al aminoácido no natural.

[0078] En algunas realizaciones, se describe en la presente memoria un activador de una célula auxiliar CD4+, una células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, una célula asesina natural (NK) o una célula T asesina natural

(NKT) que expande selectivamente las células auxiliares CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, células NK, células NKT, o una combinación de los mismos en una población de células, en donde dicho activador comprende un polipéptido de interleucina 2 (IL-2) modificado que comprende al menos una mutación. En algunos casos, la mutación es a un aminoácido natural. En otros casos, la mutación es a un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un activador de una célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, una célula asesina natural (NK) o una célula T asesina natural (NKT) que expande selectivamente las células auxiliares CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, células NK, células NKT o una combinación de los mismos en una población de células, en donde dicho activador comprende un polipéptido de interleucina 2 (IL-2) modificado que comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, dicho activador expande las células Treg CD4+ (Treg) en menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o menos del 0.1% cuando dicho activador está en contacto con dicha población de células CD3+ en comparación con una expansión de células CD4+ Treg en la población de células CD3+ en contacto con un polipéptido tipo salvaje IL-2. En algunos casos, dicho activador no expande las células Treg en dicha población de células. En algunos casos, dicha

población de células es una población de células in vivo. En algunos casos, dicha población de células es una población de células in vitro. En algunos casos, dicha población de células es una población de células ex vivo.

[0079] En algunos casos, también se describe en el presente documento un método para expandir una célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, una célula asesina natural (NK) o una población de células T asesinas naturales (NKT), que comprende poner en contacto dicha célula población con una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, una célula asesina natural (NK) o un activador de células T asesinas naturales (NKT), en donde dicho activador comprende una interleucina 2 modificada (IL-2) polipéptido que comprende al menos una mutación, expandiendo así la célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, la célula asesina natural (NK) o la población de células T asesina natural (NKT). En algunos casos, la mutación es a un aminoácido natural. En otros casos, la mutación es a un aminoácido no natural. En algunos casos, también se describe en el presente documento un método para expandir una célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, una célula asesina natural (NK) o una población de células T asesinas

naturales (NKT), que comprende poner en contacto dicha población de células con un cantidad terapéuticamente efectiva de una célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, una célula asesina natural (NK) o un activador de células T asesinas naturales (NKT), en donde dicho activador comprende un polipéptido de interleucina 2 (IL-2) modificado que comprende al menos un aminoácido no natural, lo que expande la célula auxiliar CD4+, células T efectoras ingenuas y de memoria CD8+, la célula asesina natural (NK) o la población de células T asesinas naturales (NKT).

Conjugados de IL-15

[0080] En algunas realizaciones, se describen en el presente documento conjugados de IL-15 modificados en una posición de aminoácidos. IL-15 regula la activación y proliferación de células T y células NK. En algunos casos, el conjugado de IL-15 comprende un polipéptido IL-15 aislado y purificado y un residuo conjugado. En algunos casos, el conjugado de IL-15 tiene una afinidad disminuida a un receptor de IL-15 en relación con un polipéptido tipo salvaje de IL-15. En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de aminoácido que interactúa con el receptor de IL-15 (por ejemplo, en una interfaz IL-15/IL-15Rα) o con las subunidades IL-2Rβγ. En algunos casos, el residuo conjugado se une a un residuo de

aminoácido que está próximo a la interfaz IL-15/IL-15Rα (por ejemplo, aproximadamente 5 Å, aproximadamente 10 Å, aproximadamente 15 Å o aproximadamente 20 Å lejos de IL-15/IL-15Rα interfaz) o proximal a las subunidades IL-2Rβγ. Como se usa en el presente documento, los residuos implicados en la interfaz IL-15/IL-15R comprenden residuos de IL-15 que forman interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas con residuos de IL-15R. De manera similar, los residuos implicados en la interfaz IL-15/IL-2Rβγ comprenden residuos IL-15 que forman interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas con residuos de las subunidades IL-2Rβγ. En algunos casos, el residuo conjugado está unido a la N-terminal o a la C-terminal del polipéptido IL-15 (por ejemplo, al residuo de aminoácido N-terminal o C-terminal o a un grupo reactivo unido al amino terminal residuo ácido), ya sea directa o indirectamente a través de un péptido conector. En casos adicionales, el residuo conjugado modula la interacción entre IL-15 e IL-15R. En algunos casos, el conjugado IL-15 regula al alza a distintas poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumores a través de la señalización IL-15/IL-15R. En algunos casos, el conjugado IL-15 promueve una disminución en la proliferación o expansión de los linfocitos asociados a tumores. En algunos casos, el conjugado de IL-15 modula la

actividad inmune.

Conjugados De Citoquinas Adicionales

[0081] En algunas realizaciones, descritas en el presente documento, se incluyen uno o más conjugados de citocinas adicionales modificados en una posición de aminoácidos. Los ejemplos de citocinas incluyen, entre otros, IL-1β, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, un INF (por ejemplo, IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-δ, IFN-ε, IFN-τ, IFN-ω o IFN-ζ) y un TNF (por ejemplo, TNFα o CD40L). 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 citoquinas tiene una afinidad disminuida a su receptor respectivo en relación con su citocina 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, aproximadamente 10 Å, aproximadamente 15 Å o aproximadamente 20 Å lejos de la interfaz del receptor). En algunos casos, el residuo conjugado está unido a la N-terminal o a la C-terminal de la citocina, ya sea directa o indirectamente a través de un péptido conector. En casos adicionales, el residuo conjugado modula la interacción entre la citocina y su receptor respectivo. En algunos casos, el conjugado de citocinas regula al alza a distintas poblaciones de linfocitos

infiltrantes de tumores. En algunos casos, el conjugado de citoquinas promueve una disminución en la proliferación o expansión de los linfocitos asociados a tumores. En algunos casos, el conjugado de citoquinas modula la actividad inmune.

Precursores Conjugados De Citoquinas

[0082] En el presente documento se describen precursores conjugados de citocinas, que comprenden una citocina mutación (tal como IL-2), en la que uno o más aminoácidos han sido mutados del aminoácido 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, eliminaciones o sustituciones. En algunas realizaciones, la mutación comprende la sustitución por un aminoácido natural diferente. En algunos casos, la citocina mutación comprende una mutación en la posición de aminoácidos Y31, K32, N33, P34, K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, P47, K48, Q57, E60, E61, E62, L63, K64, P65, E68, V69, N71, L72, Q74, S75, K76, N77, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111 o A112, 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 de Y31, K32, N33, P34, K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, P47, K48, E61, E62, E68, K64,

P65, V69, L72, Q74, S75, K76, N77, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111 y A112. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona de N33, P34, K35, T37, R38, M39, T41, F42, K43, F44, Y45, Q57, E60, E61, E62, L63, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111 y A112. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre T37, T41, F42, F44, Y45, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de R38 y K64. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de E61, E62 y E68. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K35. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T37. En algunos casos, la posición del aminoácido está en R38. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en T41. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en F42. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K43. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en F44. En algunos

casos, la posición de los aminoácidos está en Y45. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en E61. En algunos casos, la posición del aminoácido está en E62. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en K64. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en E68. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en P65. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en V69. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L72. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en Y107. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en L72. En algunos casos, la posición de los aminoácidos está en D109. 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 mutación.

[0083] Las mutaciones de citocinas descritos en el presente documento a menudo comprenden una o más mutaciones a aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, una mutación de citocina comprende la SEQ ID NO:1, y al menos una mutación. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62K. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62C. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62A. En algunas realizaciones, la mutación de citocina

comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62I. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62L. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62Y. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62W. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62N. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62R. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62D. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62Q. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62G. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62H. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62M. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62F. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62P. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62S. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación

E62T. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación E62V.

[0084] En algunas realizaciones, una mutación de citocina comprende la SEQ ID NO:1, y al menos una mutación. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65K. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65C. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65A. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65I. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65L. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65Y. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65W. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65N. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65R. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65D. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65Q. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación

P65G. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65H. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65M. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65F. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65E. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65S. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65T. En algunas realizaciones, la mutación de citocina comprende la SEQ ID NO: 1 y una mutación P65V.

Fusiones De Proteínas O Péptidos

[0085] 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 conjugado. 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, Fab_2 divalente, fragmentos $F(ab)'_3$, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, $(scFv)_2$, dicuerpo, minicuerpo, 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. Dichas proteínas de fusión en algunos 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 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.

[0086] En algunos casos, el conjugado de citocina 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 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 descritos a continuación.

[0087] 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 de IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_3, o IgG_4). En algunos casos, la citocina fusionada a la porción Fc se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación descritos a continuación.

[0088] 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 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, Fragmentos $F(ab)'_3$, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, $(scFv)_2$, dicuerpo, minicuerpo, 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. 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, IgG_1, IgG_3 o IgG_4). En algunos casos, la citocina fusionada con el anticuerpo, o sus fragmentos de unión del mismo, se conjuga adicionalmente con uno o más residuos de conjugación descritos a continuación.

[0089] 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 divalente, fragmentos F(ab)'3, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)2, dicuerpo, minicuerpo, 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. 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 ejemplo, IgG_1, IgG_3 o IgG_4). 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

[0090] 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.

[0091] 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

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 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, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, *p*-Boronofenilalanina, *O*-propargiltirosina, L-fosfoserina, fosfonioserina, fosfoniotirosina, p-bromofenilalanina, seleniocisteína, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, azido-lisina (AzK), un análogo antinatural 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 a-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.

[0092] 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), química “foto-click” o un proceso mediado por metales como la metátesis de olefina y el acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura o Sonogashira.

[0093] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un grupo fotorreactivo, que reticula, tras la irradiación con, por ejemplo, UV.

[0094] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un aminoácido fotoenjaulado.

[0095] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de aminoácido para-sustituido, meta-sustituido u orto-sustituido.

[0096] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende, p-acetil-L-fenilalanina, p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), 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, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonioserina, fosfoniotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, o isopropil-L-fenilalanina.

[0097] En algunos casos, el aminoácido no natural es 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxi-fenilalanina, o 3-yodotirosina.

[0098] En algunos casos, el aminoácido no natural es fenilseleniocisteína.

[0099] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de fenilalanina que contiene benzofenona, cetona, yoduro, metoxi, acetilo, benzoilo o azida.

[0100] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que contiene benzofenona, cetona, yoduro, metoxi, acetilo, benzoilo o azida.

[0101] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende una cadena lateral aromática.

[0102] En algunos casos, el aminoácido no natural no comprende una cadena lateral aromática.

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

[0104] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo aceptador de Michael. En algunos casos, los grupos aceptadores de Michael comprenden un residuo insaturado capaz de formar un enlace covalente a través de una reacción de adición 1,2. En algunos casos, los grupos aceptadores de Michael comprenden alquenos o alquinos deficientes en electrones. En algunos casos, los grupos

aceptadores de Michael incluyen, entre otros, alfa, beta, insaturados: cetonas, aldehídos, sulfóxidos, sulfonas, nitrilos, iminas o compuestos aromáticos.

[0105] En algunos casos, el aminoácido no natural es la deshidroalanina.

[0106] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo aldehído o cetona.

[0107] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende un grupo aldehído o cetona.

[0108] 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.

[0109] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina en donde el átomo de epsilon N se reemplaza con un átomo de oxígeno.

[0110] En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que no es lisina natural modificada post-traduccionalmente.

[0111] 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. 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 cadena lateral, en donde el séptimo átomo de la posición alfa es un átomo de oxígeno.

[0112] 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-hidroseleniopropanóico). 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 natural comprende selenio, en donde la oxidación del selenio da como resultado la formación de un aminoácido no natural que comprende un alqueno.

[0113] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo ciclooctinilo.

[0114] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo transcicloctenilo.

[0115] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo norbornenilo.

[0116] En algunos casos, el aminoácido no natural

comprende un grupo ciclopropenilo.

[0117] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo diazirina.

[0118] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo tetrazina.

[0119] 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 ácido hexanóico 2-amino-6-{[(terc-butoxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(terc-butoxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-Boc-N6-metillisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-acetillisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es pirrolisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-trifluoroacetillisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(benziloxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(p-yodobenziloxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(p-nitrobenziloxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el

aminoácido no natural es N6-prolillisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(ciclopentiloxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(ciclopentanecarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(tetrahidrofuran-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, el aminoácido no natural es 2-amino-6-{[(2-azidociclopentiloxi)carbonil]amino}ácido hexanóico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((2-azidoetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(2-nitrobenziloxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-{[(2-ciclooctyniloxi)carbonil]amino}. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(2-aminobut-3-inoil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanóico 2-amino-6-((2-aminobut-3-inoil)oxi). 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 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-carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido oxononanóico 2-amino-8. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido oxooctanóico 2-amino-8. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(2-oxoacetil)lisina.

[0120] En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-propionilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-butirillisina, En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(but-2-enoil)lisina, En algunos casos, el aminoácido no natural es 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)benzil)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 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.

[0121] En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido propanóico 2-amino-3-(((((benziloxi)carbonil)amino)metil)selanil).

[0122] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un codón de parada ámbar, opal u ocre reutilizado.

[0123] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un codón de 4 bases.

[0124] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un codón de sentido raro reutilizado.

[0125] 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 nucléico no natural. En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina mediante un par ortogonal 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 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 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 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 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 modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de fosfoserina modificado.

[0126] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un par aminoacilo (aaRS o RS)-ARNt sintetasa-ARNt. Los ejemplos de pares de aaRS-ARNt incluyen, pero no se limitan a, pares de *Methanococcus jannaschii* (*Mj-Tyr*) aaRS/ARNt, pares de *E. coli* TyrRS (*Ec-Tyr*)/*B. stearothermophilus* $ARNt_{CUA}$, pares de *E. coli* LeuRS (*Ec-Leu*)/*B. stearothermophilus* $ARNt_{CUA}$, 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 de *Mj-Tyr*RS/ARNt. UAAs ejemplares que se pueden incorporar mediante un par de *Mj-Tyr*RS/ARNt incluyen, pero no se limitan a, 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; fenilseleniocisteína; p-boronofenilalanina; y o-nitrobenciltirosina.

[0127] En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora a la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un par *Ec-Tyr*/$ARNt_{CUA}$ o un par *Ec-Leu*/$ARNt_{CUA}$. Los UAAs ejemplares que se pueden incorporar mediante un par *Ec-Tyr*/$ARNt_{CUA}$ o un par *Ec-Leu*/$ARNt_{CUA}$ 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.

[0128] 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 UAAs ejemplares que se pueden incorporar mediante un par pirrolisil-ARNt incluyen, pero no se limitan a, lisinas sustituidas con amida y carbamato tales como, ácido hexanóico 2-amino-6-((R)-tetrahidrofuran-2-

carboxamido), *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.

[0129] 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 UAAs ejemplares que pueden incorporarse mediante tales sintetasas incluyen para-metilazido-L-fenilalanina, aralquilo, heterociclilo, heteroaralquilo, aminoácidos no naturales y otros. En algunas realizaciones, tales UAAs comprenden piridilo, pirazinilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo, 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, tales sintetasas se expresan y usan para incorporar UAAs en citocinas in vivo. En algunas realizaciones, tales sintetasas se usan para incorporar UAAs en citocinas usando un sistema de traducción libre de células.

[0130] En algunos casos, se incorpora un aminoácido no natural en 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 sintetasas correspondientes al aminoácido auxotrófico son capaces de cargar el correspondiente ARNt con un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es seleniocisteína, o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es 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 aminoácido auxotrófico.

[0131] En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la Figura 1.

[0132] 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], Biocheim 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).

[0133] En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en las Figuras 3A a 3D (adoptado de la Tabla 1 de Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69).

[0134] En algunas realizaciones, un aminoácido no natural incorporado en una citocina descrita en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido IL) se describe en el documento 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 sintetasas incluyen para-metilazido-L-fenilalanina, aralquilo, heterociclilo y heteroaralquilo, y aminoácidos no naturales derivados de lisina. En algunas realizaciones, tales UAAs comprenden piridilo, pirazinilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo, 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, los UAAs comprenden una azida unida a un residuo aromático a través de un enlazador de alquilo. En algunas realizaciones, un conector de alquilo es un conector de C1-C10. En algunas realizaciones, los UAAs comprenden una tetrazina unida a un residuo aromático a través de un enlazador de alquilo. En algunas realizaciones, los UAAs comprenden una tetrazina unida a un residuo aromático a través de un grupo amino. En algunas realizaciones, los UAAs comprenden una tetrazina unida a un residuo aromático a través de un grupo alquilamino. En algunas realizaciones, los UAAs comprenden una azida unida al nitrógeno terminal (por ejemplo, N6 de un 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, los UAAs comprenden una tetrazina unida al nitrógeno terminal de una cadena lateral de aminoácidos a través de una cadena de alquilo. En algunas realizaciones, los UAAs comprenden una azida o tetrazina unida a una amida a través de un conector de alquilo. En algunas realizaciones, los UAAs es un carbamato o amida que contiene azida o tetrazina de 3-

aminoalanina, serina, lisina o derivado de la misma. En algunas realizaciones, tales UAAs se incorporan a las citocinas in vivo. En algunas realizaciones, tales UAAs se incorporan a las citocinas en un sistema libre de células.

Residuos Conjugados

[0135] 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 conjugado se une a la citocina a través de un enlace covalente. En algunos casos, una citocina descrita en el presente documento está unida a un residuo conjugado con un grupo triazol. En algunos casos, una citocina descrita en el presente documento está unida a un residuo conjugado con un grupo dihidropiridazina o piridazina. En algunos casos, el residuo conjugado comprende un polímero soluble en agua. En otros casos, el residuo conjugado comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma. En casos adicionales, el residuo conjugado comprende un péptido. En casos adicionales, el residuo

conjugado comprende un ácido nucléico. En casos adicionales, el residuo conjugado comprende una molécula pequeña. En casos adicionales, el residuo conjugado comprende un bioconjugado (por ejemplo, un agonista de TLR como un agonista TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, o TLR9; o un ligando sintético tal como, Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poly I:C, poly A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2β, CFA). 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 citoquinas con uno o más dominios o subunidades de receptores de citocinas. En casos adicionales, el residuo conjugado bloquea la interacción de las citocinas con uno o más dominios o subunidades de citocinas con sus receptores afines. En algunas realizaciones, los conjugados de citoquinas 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 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 conjugado se une al aminoácido N-terminal o C-terminal del péptido de citocina. En el presente

documento se describen diversos sitios de combinaciones, por ejemplo, un primer residuo conjugado está unido a un aminoácido no natural o natural en el péptido de citocina, y un segundo residuo conjugado está unido al aminoácido N-terminal o C-terminal del péptido de citocina. En algunas realizaciones, un residuo conjugado se une a múltiples residuos del péptido de citocina (por ejemplo, una grapa). En algunas realizaciones, un residuo conjugado está unido a los aminoácidos N-terminal y C-terminal del péptido de citocina.

Polímeros Solubles En Agua

[0136] En algunas realizaciones, un residuo conjugado 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 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 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 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.

[0137] En algunos casos, el polímero soluble en agua se caracteriza por tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 300 terminales. Los ejemplos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, poli(alquileno glicoles) tales como polietileno glicol ("PEG"), poli(propileno glicol) ("PPG"), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliacrilamida (PAAm), poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (PHPMA), polidimetilacrilamida (PDAAm), polifosfaceno, polioxazolinas ("POZ") (los cuales se describen en WO 2008/106186), poli(N-acriloilmorfolina), y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

[0138] 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 poliol), 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.

[0139] 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 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 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 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.

[0140] Los pesos moleculares promedio en peso ejemplares 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 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.

[0141] Los PEG comprenderán típicamente un número de monómeros (OCH_2CH_2) [o monómeros (CH_2CH_2O), 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 "$(OCH_2CH_2)n$". Por lo tanto, el valor de (n) 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 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 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.

[0142] En algunos casos, el polímero soluble en agua es un polímero con tapa terminal, es decir, un polímero que tiene al menos un C-terminal cubierto con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C1-6 inferior o un grupo hidroxilo. Cuando el polímero es PEG, por ejemplo, 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 (-OCH3), mientras que el otro extremo es un hidroxilo u otro grupo funcional que puede

modificarse químicamente, de manera opcional.

[0143] En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 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.

[0144] 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(alquileno glicoles) tales como polietileno glicol ("PEG"), poli(propileno glicol) ("PPG"), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliacrilamida (PAAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (PHPMA), polifosfaceno, polioxazolinas ("POZ"), poli(N-acriloilmorfolina), y a 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.

[0145] En algunas realizaciones, un polipéptido IL-2 descrito en el presente documento se conjuga con un polímero soluble en agua seleccionado de poli(alquileno glicoles) tales como polietileno glicol ("PEG"), poli(propileno glicol) ("PPG"), copolímeros de etileno glicol y propileno glicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliacrilamida (PAAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (PHPMA), polifosfaceno, polioxazolinas ("POZ"), poli(N-acriloilmorfolina), y una combinación de los mismos. En algunos casos, el polipéptido 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.

[0146] En algunos casos, un polímero soluble en agua comprende un poliglicerol (PG). En algunos casos, el poliglicerol es un PG hiperramificado (HPG) (por ejemplo, según lo descrito por Imran, et al. "Influence of architecture of high molecular weight linear and branched

polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution," [Influencia de la arquitectura de los poligliceroles lineales y ramificados de alto peso molecular en su biocompatibilidad y 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(glycerol)–protein conjugates," [Síntesis mediada por ácido escuárico y actividad biológica de una biblioteca de poli(glicerol) lineal e hiperramificado-conjugados de proteínas], Biomacromolecules 13:1161–1171 (2012)), o un PG funcional de cadena lateral (por ejemplo, según lo descrito por Li, et. al., "Synthesis of linear polyeter polyol derivatives as new materials for bioconjugation," [Síntesis de derivados de poliéter-poliol lineales como nuevos materiales para bioconjugación], Bioconjugate Chem. 20: 780–789 (2009).

[0147] 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.

[0148] 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) metil metacrilato] (POEGMA); derivados de PEG modificados con esqueleto generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequélico o di-funcional; derivados de PEG que comprenden comonómeros que comprenden enlaces degradables tales como poli[(etileno oxie)-co-(metileno óxido de etileno)][P(EO-***CO***-MEO)], acetales ceténicos 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) copolimerizado con OEGMA; or poli-(ε-caprolactona)-graft-poli(óxido de etileno) (PCL-g-PEO).

[0149] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) descrito en el presente documento se conjuga con una alternativa PEG sintética degradable, como, por ejemplo, POEGM; derivados de PEG modificados con esqueleto generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequélicos o di-funcionales; P(EO-co-MEO); acetales de ceteno 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 sintética degradable, como, por ejemplo, POEGM; derivados de PEG modificados con esqueleto generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequélicos o di-funcionales; P(EO-co-MEO); acetales de ceteno cíclicos tales como BMDO, MDO y MPDL copolimerizados con OEGMA; o PCL-g-PEO.

[0150] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua comprende un poli(zwitteriones). Los ejemplos de poli(zwitteriones) incluyen, pero no se limitan a, poli(sulfobetaína metacrilato) (PSBMA), poli(carboxibetaína metacrilato) (PCBMA), y poli(2-metiacriloiloxietil fosforilcolina) (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(ion híbrido) tal 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(zwitteriones) como PSBMA, PCBMA o PMPC.

[0151] En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua comprende un policarbonato. Los policarbonos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, pentafluorofenil 5-metil-2-oxo-1,3-dioxano-5-carboxilato (MTC-OC_6F_5). En algunos casos,

un polipéptido de citocina (por ejemplo, un polipéptido de interleucina, IFN, o TNF) descrito en el presente documento, se conjuga con un policarbonato, tal como MTC-OC_6F_5. 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-OC_6F_5.

[0152] 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 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 polímero zwitterion derivatizado (por ejemplo, un polímero PEG derivatizado que contiene hidroxilo o zwitterion). 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 conjugado péptido/proteína-polímero, o un polímero derivado hidroxilo o zwitterion (por ejemplo, un hidroxilo o polímero

zwitterion PEG derivatizado).

[0153] En algunos casos, un polímero soluble en agua comprende un polisacárido. Los polisacáridos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, dextrano, ácido polisálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, sulfato de heparán (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 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.

[0154] En algunos casos, un polímero soluble en agua 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 algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con glucanos unidos a N. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga

con glicanos unidos a O. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con glicolípidos. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con O-GlcNAc. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con glicosaminoglicanos.

[0155] 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).

[0156] 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. 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.

[0157] 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 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 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, hexametilendiamina, tetraetilmetilendiamina o piperazina.

[0158] 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 TNF) se conjuga con un conector descrito en la patente de los Estados Unidos No. 7,744,861, 8,273,833, o 7,803,777. En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con un conector descrito en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7,744,861, 8,273,833, o 7,803,777.

Lípidos

[0159] En algunas realizaciones, un residuo conjugado descrito aquí es un lípido. En algunos casos, el lípido es un ácido graso. En algunos casos, el ácido graso es un ácido graso saturado. En otros casos, el ácido graso es un ácido graso insaturado. Ejemplos de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos que comprenden 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 algunos casos, el lípido se une a una o más proteínas séricas, lo que aumenta la estabilidad o la semivida sérica.

[0160] En algunas realizaciones, el lípido se conjuga con IL-2. En algunos casos, el lípido es un ácido graso, por ejemplo, un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado. En algunos casos, el ácido graso es 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 algunos casos, el ácido graso comprende aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 átomos de carbono de longitud. En algunos casos, el ácido graso comprende ácido caproico (ácido hexanóico), ácido enantico (ácido heptanóico), ácido caprílico (ácido

octanóico), ácido pelargónico (ácido no nanóico), ácido cáprico (ácido decanóico), ácido undecílico (ácido undecanóico), ácido láurico (ácido dodecanóico), ácido tridecílico (ácido tridecanóico), ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido pentadecílico (ácido pentadecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido margárico (ácido heptadecanóico), ácido esteárico (ácido octadecanóico), nonadecíclico ácido (ácido nodecanóico), ácido araquídico (ácido eicosanóico), ácido heneicosílico (ácido heneicosanóico), ácido behénico (ácido docosanóico), ácido tricosílico (ácido tricosanóico), ácido lignocérico (ácido tetracosanóico), ácido pentacosílico (ácido pentacosanóico) o ácido cerótico (ácido hexacosanóico).

[0161] En algunas realizaciones, el conjugado lipídico de IL-2 mejora la estabilidad del suero o la vida media del suero.

Proteínas

[0162] En algunas realizaciones, un residuo conjugado 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.

[0163] 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.

[0164] 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.

[0165] 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.

[0166] 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 Fe3+ 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.

[0167] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con 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.

[0168] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga

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.

[0169] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es transtiretina (TTR). La transtiretina es una proteína de transporte ubicada en el suero y el líquido cefalorraquídeo que transporta la hormona tiroidea tiroxina (T4) y la proteína de unión al retinol unida al retinol.

[0170] En algunos casos, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con transtiretina (a través de uno de sus extremos o a través de una región de bisagra interna). En algunos casos, el polipéptido de citocina se conjuga con un fragmento funcional de transtiretina.

[0171] En algunos casos, un polipéptido IL-2 se conjuga con transtiretina (a través de uno de sus términos o a través de una región de bisagra interna). En algunos casos, el polipéptido IL-2 se conjuga con un fragmento funcional de transtiretina.

[0172] 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, fragmentos F(ab)'3, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)2, dicuerpo, minicuerpo, 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.

[0173] 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.

[0174] En algunos casos, el residuo conjugado 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).

[0175] 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 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, Fragmentos F(ab)'3, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)2, dicuerpo, minicuerpo, 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. 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).

[0176] 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, fragmentos F(ab)'3, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)2, dicuerpo, minicuerpo, 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. 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).

[0177] 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 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, Fragmentos F(ab)'3, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), bis-scFv, (scFv)2, dicuerpo, minicuerpo, 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. 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 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.

[0178] En algunos casos, uno o más conjugados de polipéptido IL-2-polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG) se unen adicionalmente a un anticuerpo o fragmentos de unión del mismo. En algunos casos, la relación del conjugado IL-2 con el anticuerpo es aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 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 relación del conjugado IL-2 con el anticuerpo es aproximadamente 6: 1 o superior.

[0179] En algunas realizaciones, el uno o más conjugados de polipéptido IL-2-polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG) se unen directamente al anticuerpo o 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, enlazadores de traza cero, enlazadores autoinmolativos, espaciadores y similares.

[0180] En algunas realizaciones, el anticuerpo o 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-2Rβγ. En 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-2Rβγ. En casos adicionales, el sitio de conjugación del anticuerpo con el polipéptido IL-2 está en un sitio que impedirá o impedirá aún más la unión del polipéptido IL-2 con el IL-2Rα. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo se unen directa o indirectamente a la porción de polímero soluble en agua del polipéptido IL-2-conjugado de polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG).

Péptidos

[0181] En algunas realizaciones, un residuo conjugado descrito aquí es un péptido. En algunos casos, el péptido es 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 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.

[0182] En algunos casos, el residuo conjugado es un péptido XTEN™ (Amunix Operating Inc.) y la modificación se denomina XTENilación. La 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.

[0183] En algunos casos, el residuo de conjugación 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 (Gli4Ser) 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.

[0184] 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 nucléico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucléico 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.

[0185] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es un polipéptido similar a elastina (ELP) y la modificación se denomina ELPilación. La ELPilación es la fusión genética de un ácido nucléico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucléico 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.

[0186] En algunas realizaciones, el residuo conjugado es un péptido CTP. Un péptido CTP comprende un péptido con 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 polipéptido de citocina (por ejemplo, un polipéptido IL-2) se conjuga con un péptido CTP.

[0187] En algunas realizaciones, una citocina (por ejemplo, un polipéptido IL-2) se modifica por glutamilación. La glutamilación (o poliglutamilación) es una modificación reversible postraduccional 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.

[0188] En algunas realizaciones, una citocina (por 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 Gli-Xaa-Ya en donde Xa y Ya comprenden principalmente prolina y 4-hidroxiprolina, respectivamente. En algunos casos, el polímero GLK comprende, además, residuos de aminoácidos Pro, Gli, Glu, Qln, Asn, Ser y Lis. 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.

Residuos Conjugados Adicionales

[0189] 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-H3, B7-H6, CD70, CEA, CSPG4, EGFRvIII, Efa3, EpCAM, EGFR, ErbB2 (HER2), FAP, FRα, GD2, GD3, Lewis-Y, mesotelina, Muc1,

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 algunos casos, el residuo conjugado se fusiona genéticamente, por ejemplo, en el extremo N o el C-terminal de la citocina (por ejemplo, IL-2).

[0190] En algunos casos, el residuo conjugado comprende una molécula de una modificación postraduccional. En algunos casos, los ejemplos de modificación postraduccional 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 postraduccional como 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.

Conjugación

Enlazadores

[0191] En algunas realizaciones, los grupos reactivos funcionales útiles para conjugar o unir un residuo conjugado a un polipéptido de citocina (por ejemplo, un 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 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 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 enlazadores homobifuncionales o enlazadores heterobifuncionales. Los enlazadores homobifuncionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, reactivo de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis(sulfosuccinimidilo proprionato (DTSSP), disuccinimidilo suberato (DSS), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS), disuccinimidilo tartrato (DST), disulfosuccinimidila 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'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), compuesto que contiene aril halido (DFDNB), tales como por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno or 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenceno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), formaldehído, glutaraldehído, 1,4-butanediol diglicidil éter, dihidrazida de ácido adípico, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α'-p-diaminodifenil,

diyodo-p-xileno ácido sulfónico, N,N′-etileno-bis(yodoacetamida), o N,N′-hexametileno-bis(yodoacetamida).

[0192] En algunas realizaciones, el enlazador bifuncional comprende un enlazador heterobifuncional. Los enlazadores heterobifuncionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, reticuladores reactivos con amina 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 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), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBs), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida éster (sulfo-MBs), N-succinimidil(4-yodoacteil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidil(4-yodoacteil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida éster (GMBs), N-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida éster (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), p-nitrofenil yodoacetato (NPIA), enlazadores cruzados reactivos al carbonilo y reactivos al sulfhidrilo tales como ácido butírico 4-(4-N-maleimidofenil) hidrazida (MPBH), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH), enlazadores cruzados reactivos a la amina y fotoreactivos tales como ácido azidosalicílico N-hidroxisuccinimidil-4 (NHs-AsA), ácido azidosalicílico N-hidroxisulfosuccinimidil-4 (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidil-2-(ρ-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-NOs), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3′-ditiopropionato (sAND),

N-succinimidil-4(4-azidofenil)1,3′-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidil(4-azidofenil)-1,3′-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidilo 4-(ρ-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidilo 2-(7-azido-4-metilcoumarin-3-acetamida)etil-1,3′-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidilo 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), ρ-nitrofenil diazopiruvato (ρNPDP), ρ-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), enlazadores cruzados reactivos al sulfhidrilo y fotoreactivos tales como, 1-(ρ-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(ρ-azidosalicilamido)butil]-3′-(2′-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, benzofenona-4-maleimida, enlazadores cruzados reactivos al carbonilo y fotoreactivos tales como ρ-azidobenzoil hidrazida (ABH), enlazadores cruzados reactivos al carboxilato y fotoreactivos, tales como 4-(ρ-azidosalicilamido)butilamina (AsBA), y enlazadores cruzados reactivos a la arginina y fotoreactivos tales como ρ-azidofenil glioxal (APG).

[0193] 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 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 y arilhidrazida. En algunas realizaciones, un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en este documento comprende un grupo electrófilo.

[0194] 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 (Val-Cyt), fenilalanina-lisina (Fe-Lys), valina-alanina (Val-Ala) y valina-lisina (Val-Lys). En algunas realizaciones, el conector de dipéptido es valina-citrulina.

[0195] 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 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.

[0196] En algunas realizaciones, el enlazador comprende

un residuo enlazador autoinmolativo. En algunas 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 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.

[0197] En algunas realizaciones, el enlazador escindible es glucurónido. En algunas realizaciones, el enlazador 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.

[0198] 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 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-1-carboxilato (sulfo-sMCC), descrito arriba.

[0199] 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 maleimida para proporcionar catálisis intramolecular de la hidrólisis del anillo de tiosuccinimida, eliminando así que la maleimida sufra una reacción de eliminación a través de una reacción retro-Michael. En algunos casos, la maleimida autoestabilizante es un grupo de maleimida descrito en Lyon, 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.

Química De Conjugación

[0200] 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 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 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 documento se describe en Chen, X.; Wu Y-W. Org. Biomol. Chem 2016, 14, 5417.

[0201] 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 arilo o heteroarilamino para formar una imina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de un aldehído con un grupo arilo o heteroarilamino 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.

[0202] 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.

[0203] 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 "clic"). 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 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 presente documento comprende la reacción de un grupo alilo C-terminal un tetrazol y una luz. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un grupo alquinilo C-terminal un tetrazol y una luz. En algunas realizaciones, una reacción de 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.

[0204] 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 dieno tenso. 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 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.

[0205] 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 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 tensos.

[0206] 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.

[0207] En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de desprotección o "liberación" 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 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 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 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 resultado la desprotección del grupo reactivo.

[0208] 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 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 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 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 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(bpi)3]) y la luz.

[0209] Las reacciones enzimáticas se usan opcionalmente para las reacciones de conjugación descritas en este 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.

[0210] En el presente documento se describen diversas reacciones de conjugación para hacer reaccionar un enlazador o residuo conjugado 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 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

Enfermedades O Afecciones Proliferativas

[0211] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad o afección proliferativa en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito Aquí en. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido IL-2 aislado y purificado y un residuo de conjugación, en donde el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida a una subunidad del receptor de IL-2 α (IL-2Rα) en relación con un salvaje polipéptido IL-2 tipo. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en una posición de aminoácidos seleccionada de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el conjugado IL-2 interactúa preferentemente con las subunidades IL-2Rβ e IL-2Rβγ para formar un complejo

IL-2/IL-2Rβγ. En algunos casos, el complejo IL-2/IL-2Rβγ estimula o mejora la expansión de las células auxiliares CD4+, las células T ingenuas efectoras CD8+ y las células T de memoria, células NK o células NKT. En casos adicionales, la expansión de las células de Teff sesga la relación Teff: Treg hacia la población de Teff.

[0212] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección proliferativa es un cáncer. En algunos casos, el cáncer es un tumor sólido. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ojos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de próstata. En algunos casos, el tumor sólido es un cáncer metastásico. En algunos casos, el tumor sólido es un cáncer recidivante o refractario.

[0213] En algunos casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, interleucina, IFN o TNF) descrito en este documento se administra a un sujeto que lo necesita, para tratar un tumor sólido. En tales casos, el sujeto tiene cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ojos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de

próstata. En algunos casos, el tumor sólido es un cáncer metastásico. En algunos casos, el tumor sólido es un cáncer recidivante o refractario.

[0214] En algunos casos, un conjugado de IL-2 descrito en este documento se administra a un sujeto que lo necesita, para tratar un tumor sólido. En tales casos, el sujeto tiene un cáncer de vejiga, un cáncer de huesos, un cáncer de cerebro, un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer de esófago, un cáncer de ojos, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un melanoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas o un cáncer de próstata. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de vejiga. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de mama. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer colorrectal. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de esófago. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de cabeza y cuello. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de riñón. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el

tratamiento de un cáncer de pulmón. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un melanoma. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de ovario. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de páncreas. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de próstata.

[0215] En algunas realizaciones, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer metastásico. En algunos casos, el cáncer metastásico comprende un cáncer de vejiga metastásico, cáncer de hueso metastásico, cáncer de cerebro metastásico, cáncer de seno metastásico, cáncer colorrectal metastásico, cáncer esofágico metastásico, cáncer ocular metastásico, cáncer metastásico de cabeza y cuello, cáncer metastásico de riñón, cáncer metastásico de pulmón, melanoma metastásico, cáncer de ovario metastásico, cáncer pancreático metastásico o cáncer de próstata metastásico. En algunos casos, el conjugado IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento del cáncer de vejiga metastásico, cáncer de hueso metastásico, cáncer de cerebro metastásico, cáncer de mama metastásico, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de esófago metastásico,

cáncer ocular metastásico, cabeza y cuello metastásicos, cabeza y cuello metastásicos, cabeza y cuello metastásicos cáncer, cáncer de riñón metastásico, cáncer de pulmón metastásico, melanoma metastásico, cáncer de ovario metastásico, cáncer pancreático metastásico o cáncer de próstata metastásico.

[0216] En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer recidivante o refractario. En algunos casos, el cáncer recidivante o refractario comprende un cáncer de vejiga recidivante o refractario, cáncer de hueso recidivante o refractario, cáncer de cerebro recidivante o refractario, cáncer de mama recidivante o refractario, cáncer colorrectal recidivante o refractario, cáncer de esófago recidivante o refractario, recidivante o refractario cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello recidivante o refractario, cáncer de riñón recidivante o refractario, cáncer de pulmón recidivante o refractario, melanoma recidivante o refractario, cáncer de ovario recidivante o refractario, cáncer de páncreas recidivante o refractario, o cáncer de próstata recidivante o refractario. En algunos casos, el conjugado IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de vejiga recidivante o refractario, cáncer de hueso recidivante o refractario, cáncer de cerebro recidivante o refractario,

cáncer de mama recidivante o refractario, cáncer colorrectal recidivante o refractario, recidivante o cáncer de esófago refractario, cáncer de ojo recidivante o refractario, cáncer de cabeza y cuello recidivante o refractario, cáncer de riñón recidivante o refractario, cáncer de pulmón recidivante o refractario, cáncer de ovario recidivante o refractario, cáncer de ovario recidivante o refractario, cáncer de páncreas recidivante o refractario, o recidivante o cáncer de próstata refractario.

[0217] En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer sin tratamiento previo. En tales casos, el cáncer sin tratamiento previo es un cáncer que no ha sido tratado con una terapia. En algunos casos, el cáncer sin tratamiento previo es un tumor sólido, como cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ojos, cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o de próstata. En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un método para tratar un tumor sólido sin tratamiento previo en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito en el presente documento.

[0218] En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor

maligno hematológico. En algunos casos, la neoplasia hematológica comprende una leucemia, un linfoma o un mieloma. En algunos casos, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna de células T. En otros casos, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna de células B. Los tumores malignos hematológicos ejemplares incluyen, entre otros, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinamia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma de células B de la zona marginal extraganglionar, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma no Burkitt de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor B, Leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de la zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario o granulomatosis linfomatoide.

[0219] En algunos casos, la neoplasia hematológica es un cáncer metastásico. En algunos casos, el cáncer metastásico es una neoplasia maligna de células T metastásica o una

neoplasia maligna de células B metastásica.

[0220] En algunos casos, la neoplasia hematológica es un cáncer recidivante o refractario. En algunos casos, el cáncer recidivante o refractario es un tumor maligno de células T recidivante o refractario o un tumor maligno de células B recidivante o refractario.

[0221] En algunos casos, una citocina (por ejemplo, interleucina, IFN o TNF) descrita en el presente documento se administra a un sujeto que la necesita, para tratar una neoplasia hematológica. En algunos casos, el sujeto tiene una neoplasia maligna de células T. En algunos casos, el sujeto tiene una neoplasia maligna de células B. En algunos casos, el sujeto tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinamia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma no Burkitt de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor de células B, linfocítico de células B leucemia, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas,

plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario o granulomatosis linfomatoide.

[0222] En algunos casos, un conjugado de IL-2 descrito en este documento se administra a un sujeto que lo necesita, para tratar una neoplasia hematológica. En algunos casos, el sujeto tiene una neoplasia maligna de células T. En algunos casos, el sujeto tiene una neoplasia maligna de células B. En algunos casos, el sujeto tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinamia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma no Burkitt de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor de células B, linfocítico de células B leucemia, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario o granulomatosis linfomatoide. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el

tratamiento de la CLL. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de SLL. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de FL. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de DLBCL. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de MCL. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de la macroglobulinamia de Waldenstrom. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento del mieloma múltiple. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento del linfoma de Burkitt.

[0223] En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia hematológica metastásica. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un tumor maligno de células T metastásico. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de un tumor maligno de células B metastásico. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de una leucemia linfocítica crónica metastásica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL),

linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinamia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma no Burkitt de células B de alto grado, linfoma de células B mediastínico primario (PMBL), inmunoblástico linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico precursor B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de la zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario o metastásico granulomatosis linfomatoide.

[0224] En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia hematológica recidivante o refractaria. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia de células T recidivante o refractaria. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia de células B recidivante o refractaria. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto para el tratamiento de una leucemia linfocítica crónica (CLL) recurrente o refractaria, linfoma linfocítico pequeño (SLL),

linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinamia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma no Burkitt de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de la zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria o granulomatosis linfomatoide.

Agentes Terapéuticos Adicionales

[0225] 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, un conjugado de IL-2). En otros casos, el agente terapéutico adicional y 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, IL-2 conjugado)

se administra después de la administración del agente terapéutico adicional.

[0226] En algunos casos, el agente terapéutico adicional comprende un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, una terapia dirigida, radioterapia o una combinación de los mismos. Los agentes terapéuticos adicionales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como altretamina, busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalan, oxalaplatino, temozolomida o tiotepa; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato o pemetrexed; antraciclinas tales como daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina o idarrubicina; inhibidores de topoisomerasa I tales como topotecan o irinotecan (CPT-11); inhibidores de topoisomerasa II tales como etopósido (VP-16), tenipósido o mitoxantrona; inhibidores mitóticos tales como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina o vinorelbina; o corticosteroides como prednisona, metilprednisolona o dexametasona.

[0227] En algunos casos, el agente terapéutico adicional comprende una terapia de primera línea. Como se usa en este

documento, "terapia de primera línea" comprende un tratamiento primario para un sujeto con cáncer. En algunos casos, el cáncer es un cáncer primario. En otros casos, el cáncer es un cáncer metastásico o recurrente. En algunos casos, la terapia de primera línea comprende quimioterapia. En otros casos, el tratamiento de primera línea comprende radioterapia. Un experto en la materia comprenderá fácilmente que diferentes tratamientos de primera línea pueden ser aplicables a diferentes tipos de cáncer.

[0228] En algunos casos, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) con un agente terapéutico adicional seleccionado de un agente alquilante tal como altretamina, busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalan, oxalaplatino, temozolomida o tiotepa; un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato o pemetrexed; una antraciclina como daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina o idarrubicina; un inhibidor de topoisomerasa I tal como topotecan o irinotecan (CPT-11); un inhibidor de topoisomerasa II tal como etopósido (VP-16), tenipósido o mitoxantrona; un inhibidor mitótico tal como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel,

vinblastina, vincristina o vinorelbina; o un corticosteroide como prednisona, metilprednisolona o dexametasona.

[0229] En algunos casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) descrito en la presente memoria se administra con un inhibidor de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARP). Los inhibidores ejemplares de PARP incluyen, entre otros, olaparib (AZD-2281, Lynparza®, de Astra Seneca), rucaparib (PF-01367338, Rubraca®, de Clovis Oncology), niraparib (MK-4827, Zejula®, de Tesaro), talazoparib (BMN-673, de BioMarin Pharmaceutical Inc.), veliparib (ABT-888, de AbbVie), CK-102 (anteriormente CEP 9722, de Teva Pharmaceutical Industries Ltd.), E7016 (de Eisai), iniparib (BSI 201, de Sanofi) y pamiparib (BGB-290, de BeiGene). En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se administra en combinación con un inhibidor de PARP como olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib, veliparib, CK-102, E7016, iniparib o pamiparib.

[0230] En algunos casos, un conjugado de citoquinas (por ejemplo, conjugado de IL-2) descrito en este documento se administra con un inhibidor del punto de control inmunitario. Los inhibidores ejemplares del punto de control incluyen:

[0231] Inhibidores de PD-L1 tales como MPDL3280A (RG7446) de Genentech, anticuerpo Clon 10F.9G2 anti-ratón ClF

10G.9G2 (Cat #BE0101) de BioXcell, anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 MDX-1105 (BMS-936559) y BMS-935559 de Squibb de Bristol-Meyer, MSB0010718C, clon 29E.2A3 anti-PD-L1 de ratón y MEDI4736 de AstraZeneca;

[0232] Inhibidores de PD-L2 tales como AMP-224 (Amplimmune) de GlaxoSmithKline y rHIgM12B7;

[0233] Inhibidores de PD-1 tales como el anticuerpo anti-PD-1 Clon J43 (Cat #BE0033-2) de BioXcell, anticuerpo anti-PD-1 Clon RMP1-14 (Cat #BE0146) de BioXcell, anti-mouse Anticuerpo PD-1 Clon EH12, anticuerpo anti-ratón PD-1 MK-3475 de Merck (Keytruda, pembrolizumab, lambrolizumab), anticuerpo anti-PD-1 de AnaptysBio conocido como ANB011, anticuerpo MDX-1 106 (ONO-4538), Bristol-El anticuerpo monoclonal IgG4 humano Myers Squibb nivolumab (Opdivo®, BMS-936558, MDX1106), AMP-514 y AMP-224 de AstraZeneca, y Pidilizumab (CT-011) de CureTech Ltd;

[0234] Inhibidores de CTLA-4 como el anticuerpo anti-CTLA-4 de Bristol Meyers Squibb ipilimumab (también conocido como Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 y MDX-101), clon de anticuerpo anti-CTLA4 9H10 de Millipore, tremelimumab de Pfizer (CP-675,206, ticilimumab), y el clon de anticuerpo anti-CTLA4 BNI3 de Abcam;

[0235] Inhibidores LAG3 tales como el clon de anticuerpo anti-Lag-3 eBioC9B7W (C9B7W) de eBioscience, el anticuerpo

anti-Lag3 LS-B2237 de LifeSpan Biosciences, IMP321 (ImmuFact) de Immutep, el anticuerpo anti-Lag3 BMS-986016 y el LAG-3 anticuerpo quimérico A9H12;

[0236] Inhibidores de B7-H3 tales como MGA271;

[0237] Inhibidores de KIR tales como lirilumab (IPH2101);

[0238] Inhibidores de CD137 tales como urelumab (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), PF-05082566 (anti-4-1BB, PF-2566, Pfizer) o XmAb-5592 (Xencor);

[0239] Inhibidores de PS tales como Bavituximab;

[0240] E inhibidores tales como un anticuerpo o fragmentos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, humanizado o quimérico) del mismo, moléculas de ARNi o moléculas pequeñas para TIM3, CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, OX40, GITR, ICOS, BTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGHT, LIGHT, DR3, CD226, CD2 o SLAM.

[0241] En algunos casos, el conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) se administra en combinación con pembrolizumab, nivolumab, tremelimumab o ipilimumab.

[0242] En algunos casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) descrito en la presente memoria se administra con un anticuerpo como alemtuzumab, trastuzumab, ibritumomab tiuxetan, brentuximab vedotin, ado-trastuzumab emtansina o blinatumomab.

[0243] En algunos casos, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) con un agente terapéutico adicional seleccionado de una citocina adicional. En algunos casos, la citocina adicional mejora o sinergia la expansión o proliferación de células efectoras T. En algunos casos, la citocina adicional comprende IL-1β, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21 o TNFα. En algunos casos, la citocina adicional es IL-7. En algunos casos, la citocina adicional es IL-15. En algunos casos, la citocina adicional es IL-21. En algunos casos, la citocina adicional es TNFα.

[0244] En algunos casos, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) con un agente terapéutico adicional seleccionado de un agonista del receptor. En algunos casos, el agonista del receptor comprende un ligando del receptor Tipo Toll (TLR). En algunos casos, el ligando TLR comprende TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 o TLR9. En algunos casos, el ligando TLR comprende un ligando sintético como, por ejemplo, Pam3Cis, CFA, MALP2, Pam2Cis, FSL-1, Hib-OMPC, Poli I: C, poli A: U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2β, CFA o flagelina. En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, conjugado de IL-2) se administra con uno o más agonistas de TLR seleccionados de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9. En algunos casos, el conjugado de citocinas (por ejemplo,

conjugado de IL-2) se administra con uno o más agonistas de TLR seleccionados de Pam3Cis, CFA, MALP2, Pam2Cis, FSL-1, Hib-OMPC, Poli I: C, poli A: U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2β, CFA y flagelina.

[0245] En algunas realizaciones, se usa un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) junto con una terapia de transferencia de células T adoptiva (ACT). En una realización, ACT implica la identificación de linfocitos T autólogos en un sujeto con, por ejemplo, actividad antitumoral, expansión de los linfocitos T autólogos in vitro y la posterior reinfusión de los linfocitos T expandidos en el sujeto. En otra realización, ACT comprende el uso de linfocitos T alogénicos con, por ejemplo, actividad antitumoral, expansión de los linfocitos T in vitro, y la infusión subsiguiente de los linfocitos T alogénicos expandidos en un sujeto que lo necesite. En algunos casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) descrito en el presente documento se usa junto con un linfocito T autólogo como parte de una terapia ACT. En otros casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) descrito en el presente documento se usa junto con un linfocito T alogénico como parte de una terapia ACT. En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se administra simultáneamente con la

terapia ACT a un sujeto que lo necesite. En otros casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se administra secuencialmente con la terapia ACT a un sujeto que lo necesite.

[0246] En algunas realizaciones, se usa un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) para una activación o expansión ex vivo de una transferencia de células T autólogas o alogénicas. En tales casos, el conjugado de citocina (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se usa para activar o expandir una muestra que comprende células T autólogas o alogénicas y el conjugado de citocina (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se elimina opcionalmente de la muestra antes de administrar la muestra a un sujeto que lo necesite.

[0247] En algunas realizaciones, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) con una vacuna. En algunos casos, se utiliza un conjugado de citoquinas (por ejemplo, conjugado de IL-2) en combinación con un virus oncolítico. En tales casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) actúa como un agente estimulante para modular la respuesta inmune. En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se usa con un virus oncolítico como parte de una terapia adyuvante. Los virus oncolíticos ejemplares

incluyen T-Vec (Amgen), G47Δ (Todo et al.), JX-594 (Sillajen), CG0070 (Cold Genesys) y Reolisyn (Oncolytics Biotech). En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se usa en combinación con un virus oncolítico como T-Vec, G47Δ, JX-594, CG0070 o Reolisyn.

[0248] En algunas realizaciones, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) en combinación con una radioterapia.

[0249] En algunas realizaciones, se administra un conjugado de citocina (por ejemplo, conjugado de IL-2) en combinación con cirugía.

Infecciones Patógenas

[0250] En algunas realizaciones, se describe en el presente documento un método para tratar una infección patogénica en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito en el presente documento. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido IL-2 aislado y purificado y un residuo de conjugación, en donde el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida a una subunidad del receptor de IL-2 α (IL-2Rα) en relación con un salvaje polipéptido IL-2 tipo. En algunos casos, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado

que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en una posición de aminoácidos seleccionada de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el conjugado IL-2 interactúa preferentemente con las subunidades IL-2Rβ e IL-2Rβγ para formar un complejo IL-2/IL-2Rβγ, que estimula o mejora la expansión de células auxiliares CD4+, células efectoras e ingenuas CD8+ ingenuas, células NK o células NKT. En casos adicionales, el conjugado IL-2 facilita el reconocimiento del reservorio patogénico por las células T CD8+.

[0251] En algunas realizaciones, la infección patogénica es una infección viral, en la que, tras el tratamiento con una terapia antiviral, un reservorio viral (por ejemplo, células T CD4+ en reposo) persiste en un huésped tratado. En tales casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito en el presente documento induce el reconocimiento del reservorio viral por las células T CD8+ (o células T citotóxicas). En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado de IL-2) se utiliza como monoterapia para redirigir las células T CD8+ a las células infectadas en reposo para su eliminación. En algunos casos, el conjugado de citoquinas (por ejemplo, el conjugado

de IL-2) se utiliza en combinación con una terapia adicional para redirigir las células T CD8+ a las células infectadas en reposo para su eliminación. La terapia adicional ejemplar comprende tratamientos antivirales tales como aciclovir, brivudina, docosanol, famciclovir, foscarnet, idoxuridina, penciclovir, trifluridina, valaciclovir y pritelivir.

[0252] En algunas realizaciones, el virus es un virus de ADN o un virus de ARN. Los virus de ADN incluyen virus de ADN monocatenario (ss), virus de ADN bicatenario (ds) o virus de ADN que contienen regiones de ADN ss y ds. Los virus ARN incluyen virus ARN monocatenarios (ss) o virus ARN bicatenarios (ds). En algunos casos, los virus ARNss se clasifican además en virus de ARN de sentido positivo o virus de ARN de sentido negativo.

[0253] Ejemplos de virus ADNds incluyen virus de la familia: Myoviridae, Podoviridae, Sifoviridae, Alloherpesviridae, Herpesviridae, Malacoherpesviridae, Lipothrixviridae, Rudiviridae, Adenoviridae, Ampullaviridae, Ascoviridae, Asfaviridae, Baculoviridae, Bvirudaidae, Clavir, Gviruda, Gico, burauda, Bicho Hytrosaviridae, Iridoviridae, Marseilleviridae, Mimiviridae, Nimaviridae, Pandoraviridae, Papillomaviridae, Phycodnaviridae, Plasmaviridae, Polidnaviruses, Poliomaviridae, Poxviridae, Sfaerolipoviridae y Tectiviridae.

[0254] Los virus de ADNss ejemplares incluyen virus de la familia: Anelloviridae, Bacillariodnaviridae, Bidnaviridae, Circoviridae, Geminiviridae, Inoviridae, Microviridae, Nanoviridae, Parvoviridae y Spiraviridae.

[0255] Los virus de ADN ejemplares que contienen regiones de ADN ss y ds incluyen virus del grupo de pleolipovirus. En algunos casos, los pleolipovirus incluyen el virus pleomorfo 1 de Haloarcula hispanica, el virus pleomorfo de Halogeometricum 1, el virus pleomorfo de Halorubrum 1, el virus pleomorfo de Halorubrum 2, el virus pleomorfo de Halorubrum 3 y el virus pleomorfo de Halorubrum 6.

[0256] Los virus de ARNds ejemplares incluyen virus de la familia: Birnaviridae, Chrysoviridae, Cistoviridae, Endornaviridae, Hypoviridae, Megavirnaviridae, Partitiviridae, Picobirnaviridae, Reoviridae, Rotavirus y Totiviridae.

[0257] Los virus de ARNss de sentido positivo ejemplares incluyen virus de la familia: Alfaflexiviridae, Alfatetraviridae, Alvernaviridae, Arteriviridae, Astroviridae, Barnaviridae, Betaflexiviridae, Bromoviridae, Caliciviridae, Carmotetraviridae, Closteroviridae, Coronaviridae, Dicistroviridae, Leffiridae, Leffiridae, Leffiriv, Giviridae, Marnaviridae, Mesoniviridae,

Narnaviridae, Nodaviridae, Permutotetraviridae, Picornaviridae, Potyviridae, Roniviridae, Retroviridae, Secoviridae, Togaviridae, Tombusviridae, Tymoviridae y Virgaviridae.

[0258] Los ejemplos de virus ARNss de sentido negativo incluyen virus de la familia: Arenaviridae, Bornaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Nyamiviridae, Ophioviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae y Rhabdoviridae.

[0259] En algunas realizaciones, la infección patogénica es causada por el virus de la leucemia de Abelson, el virus de la leucemia murina de Abelson, el virus de Abelson, el virus de la laringotraqueobronquitis aguda, el virus del río Adelaide, el grupo de virus asociado a Adeno, el adenovirus, el virus de la peste equina africana, el virus de la peste porcina africana, el virus del SIDA, Parvovirus de la enfermedad del visón aleutiano, alfaretrovirus, alfavirus, virus relacionado con ALV, virus de Amapari, aftovirus, aquareovirus, arbovirus, arbovirus C, grupo arbovirus A, grupo arbovirus B, grupo arenavirus, virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica argentina, arterivirus, astrovirus Grupo de herpesvirus Atelina, virus de la enfermedad de Aujezky, virus Aura, virus de la enfermedad de Ausduk, lisisavirus de murciélago australiano, aviadenovirus, virus de la eritroblastosis

aviar, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la leucemia aviar, virus de la leucosis aviar, virus de la linfomatosis aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus de la paramielitis aviar, paravirus aviar, paravirus aviar virus de la neumoencefalitis, virus de la reticuloendoteliosis aviar, virus del sarcoma aviar, grupo de retrovirus aviar tipo C, Avihepadnavirus, Avipoxvirus, virus B, virus B19, virus Babanki, herpesvirus babuino, baculovirus, virus del bosque de Barmah, virus Bebaru, virus Berrimah, betaretrovirus, Birnavirus, virus Bittner, virus BK, virus Black Creek Canal, virus de la lengua azul, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la enfermedad de Boma, enfermedad de la frontera del virus de las ovejas, virus del borna, virus alfaherpes bovino 1, virus del alfaherpes bovino 2, coronavirus bovino, virus de la fiebre efímera bovina, virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de la leucemia bovina, virus de la leucosis bovina, bovino virus de la maxilitis, virus del papiloma bovino, virus de la estomatitis papular bovina, parvovirus bovino, virus sincitial bovino, oncovirus bovino tipo C, virus de la diarrea viral bovina, virus Buggy Creek, grupo de virus en forma de bala, supergrupo del virus Bunyamwera, virus Bunya, virus del linfoma de Burkitt, Bwamba Virus CA, Calicivirus, virus de la encefalitis de California, virus de la viruela

del camello, virus de la viruela del canario, virus del herpes canino, coronavirus canino, virus del moquillo canino, parvovirus canino tipo I (canine minute virus), parvovirus canino, virus de Cabo Delgadito, virus de la artritis caprina, virus de la encefalitis caprina, virus del herpes caprino, virus Capripox, cardiovirus, virus del herpes cavídico 1, herpesvirus cercopitécico, herpesvirus del herpes virus del herpes 2, Virus de Chandipura, virus de Changuinola, virus de bagre de canal, virus de Charleville, virus de varicela, virus de Chikungunya, virus del herpes chimpancé, reovirus de chub, virus de salmón chum, virus Cocal, reovirus de salmón Coho, virus del exantema coital, virus de la fiebre por garrapatas de Colorado, Coltivirus, Columbia SK virus, virus del resfriado común, virus del etima contagioso, virus de la dermatitis pustulosa contagiosa, coronavirus, virus Corriparta, virus coryza, virus de la viruela, virus coxsackie, CPV (virus de la poliedrosis citoplasmática), virus de la parálisis del grillo, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus asociado al crup, Cryptovirus, Cypovirus, Citomegalovirus, grupo de citomegalovirus, virus de la polihedrosis citoplasmática, virus del papiloma en ciervos, deltaretrovirus, virus del dengue, Densovirus, Dependovirus, virus Dhori, virus del diploma, virus Drosophila C, virus de la hepatitis B del

pato, virus de la hepatitis 1 del pato, virus de la hepatitis del pato 2, duovirus, virus del Duvenhage, virus del ala deformada DWV, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalomielitis equina del este, virus EB, virus del Ébola, virus similar al Ébola, virus del eco, ecovirus, ecovirus 10, ecovirus 28, ecovirus 9, virus de ectromelia, virus EEE, virus EIA, virus EIA, virus de la encefalitis, virus del grupo de encefalomiocarditis, virus de la encefalomiocarditis, enterovirus, virus de elevación de enzimas, virus de elevación de enzimas (LDH), virus de la fiebre hemorrágica epidémica, virus de enfermedad hemorrágica epizoótica, virus de Epstein-Barr, virus de éterpespes equino 1, virus de éterpespes equino 2, virus de herpes equino 2, virus de aborto equino, virus de arteritis equina, virus de la encefalosis equina, virus de la anemia infecciosa equina, morbilivirus equino, virus de la rinoneumonitis equina, rinovirus equino, virus de Eubenangu, elk papil europeo lomavirus, virus de la peste porcina europea, virus Everglades, virus Eyach, virus herpes felino 1, calicivirus felino, virus fibrosarcoma felino, virus herpes felino, virus de inmunodeficiencia felina, virus peritonitis infecciosa felina, leucemia felina/virus del sarcoma, virus de la leucemia felina, virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, virus del sarcoma felino, virus sincitial felino,

Filovirus, virus de Flandes, Flavivirus, virus de la fiebre aftosa, virus Fort Morgan, hantavirus Four Corners, adenovirus 1 de las aves, virus de la viruela aviar, virus Friend, Gammaretrovirus, virus de la hepatitis GB, virus GB, virus del sarampión alemán, virus Getah, virus de la leucemia del simio gibón, virus de la fiebre glandular, virus de la viruela de la cabra, virus golden shiner, virus Gonometa, parvovirus del ganso, virus de la granulosis, virus de Gross, virus de la hepatitis B de ardilla terrestre, arbovirus del grupo A, virus Guanarito, citomegalovirus de cobaya, virus de conejillo de indias tipo C, virus de Hantaan, hantavirus, reovirus de almeja dura, virus de fibroma de liebre, HCMV (citomegalovirus humano), virus de hemadsorción 2, virus de hemaglutinación de Japón, virus de la fiebre hemorrágica, virus hendra, Henipavirus, Hepadnavirus, virus de la hepatitis A, grupo de virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis F, virus de la hepatitis G, virus de la hepatitis no A no B, virus de la hepatitis, virus de la hepatitis (no humano), hepatoencefalomielitis reovirus 3, hepatovirus, virus de la hepatitis B de la garza, virus del herpes B, virus del herpes simple, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes, virus del herpes 7, herpesvirus ateles,

herpesvirus hominis, infección por herpesvirus, herpesvirus saimiri, herpesvirus suis, herpesvirus varicellae, virus Highlands J, rabdovirus Hirame, virus del cólera porcino, adenovirus humano 2, virus alfa herpes humano 1, virus alfa herpes humano 2, virus de la bacteria del virus de la hepatitis B humana, virus del virus de la hepatitis B humana, virus beta herpes humano 5, coronavirus humano, grupo citomegalovirus humano, virus espumoso humano, virus gamma herpes humano 4, virus gamma herpes humano 6, virus de hepatitis A humano, virus herpes humano 1 grupo, virus herpes humano 2 grupo humano, virus herpes humano 3 grupo humano, virus herpes humano 4 grupo humano virus del herpes 6, virus del herpes humano 8, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia humana 1, virus de la inmunodeficiencia humana 2, virus del papiloma humano, virus de la leucemia de células T humanas, virus de la leucemia de células T humanas I, virus de la leucemia de células T humanas II, virus de la leucemia de células T humanas III, virus del linfoma de células T humanas I, virus del linfoma de células T humanas II, virus linfotrópico de células T humanas tipo 1, linfotrópico de células T humanas vi rus tipo 2, virus linfotrópico T humano I, virus linfotrópico T humano II, virus linfotrópico T humano III, Ichnovirus, virus de gastroenteritis infantil, virus de rinotraqueitis infecciosa

bovina, virus de necrosis hematopoyética infecciosa, virus de necrosis pancreática infecciosa, virus de influenza A, virus de influenza B, virus de influenza C, virus de influenza D, virus de influenza pr8, virus iridiscente de insectos, virus de insectos, iridovirus, virus B japonés, virus de encefalitis japonesa, virus JC, El virus Junin, el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, el virus Kemerovo, el virus de la rata de Kilham, el virus Klamath, el virus Kolongo, el virus de la fiebre hemorrágica coreana, el virus Kumba, el virus de la enfermedad forestal de Kysanur, el virus Kyzilagach, el virus La Crosse, el virus elevador de la deshidrogenasa láctica, el virus deshidrogenasa láctica, Virus de murciélago de Lagos, virus de Langur, parvovirus de lapina, virus de la fiebre de Lassa, virus de Lassa, virus de rata latonte, virus de LCM, virus de fugas, lentivirus, leporipoxvirus, virus de la leucemia, leukovirus, virus de la enfermedad de la piel con bultos, virus de linfadenopatía, virus de la linfadenopatía, coriomeningitis linfocítica virus, grupo de virus linfoproliferativo, virus de Machupo, virus del picor loco, grupo de oncovirus de mamífero tipo B, retroviru de mamífero tipo B ses, grupo de retrovirus tipo C de mamífero, retrovirus tipo D de mamífero, virus de tumor mamario, virus de Mapuera, virus de Marburg, virus similar a Marburg, virus de mono Mason Pfizer, virus de Mastadenov,

virus de Mayaro, virus de ME, virus de sarampión, virus de Menangle, virus de Mengo, Mengovirus, virus de Middelburg, virus del nódulo ordeñador, virus de enteritis del visón, virus diminuto de ratones, virus relacionado con MLV, virus MM, virus Mokola, virus Molluscipoxvirus, virus Molluscum contagiosum, virus mono B, virus monkeypox, Mononegavirales, Morbillivirus, virus de murciélago Mount Elgon, citomegalovirus de ratón, virus de encefalomielitis de ratón, virus de hepatitis de ratón, virus de ratón K, virus de leucemia de ratón, virus de tumor mamario de ratón, virus de minutos de ratón, virus de neumonía de ratón, virus de poliomielitis de ratón, virus de sarcoma de ratón, virus de sarcoma de ratón, virus de la viruela del ratón, virus de Mozambique, Mucambo virus, virus de la enfermedad de la mucosa, virus de la parotiditis, betaherpesvirus murido 1, citomegalovirus murino 2, grupo citomegalovirus murino, virus de la encefalomielitis murina, virus de la hepatitis murina, virus de la leucemia murina, virus inductor de nódulos murinos, poliomavirus murino, virus del sarcoma murino, Muromegalovirus, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus mixoma, Myxovirus, Myxovirus multiforme, Myxovirus parotitidis, virus de la enfermedad de las ovejas de Nairobi, Nairovirus, Nanirnavirus, virus de la nariva, virus Niva, Nedumo, virus de la nariva virus, virus Nelson Bay, virus

neurotrópico, New World Arenavirus, virus de neumonitis del recién nacido, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Nipah, virus no citopático, virus Norwalk, virus de la poliedrosis nuclear (VPN), virus del cuello del pezón, virus O'nyong'nyong, virus Ockelbo, virus oncogénico, partícula parecida a un virus oncogénico, oncornavirus, Orbivirus, virus Orf, virus Oropouche, Orthohepadnavirus, Orthomyxovirus, Orthopoxvirus, Orthoreovirus, Orungo, papillomavirus ovino, virus de la fiebre catarral ovina, herpesvirus del mono búho, papiloma, virus del papilomavial, papilomavirus, virus del papilomavirus papal virus de parainfluenza, virus de parainfluenza tipo 1, virus de parainfluenza tipo 2, virus de parainfluenza tipo 3, parainflu virus enza tipo 4, paramixovirus, parapoxvirus, virus de paravaccinia, parvovirus, parvovirus B19, grupo de parvovirus, pestivirus, phlebovirus, virus del moquillo, picodnavirus, picornavirus, virus de citomegalovirus-pigeonpox de cerdo, virus de la gripe, virus de la gripe, virus de la gripe, virus de la enfermedad de Pigeon, virus de poliomielitis, poliovirus, polidnavirus, virus poliédrico, virus de polioma, poliomavirus, poliomavirus bovis, poliomavirus cercopitheci, poliomavirus hominis 2, poliomavirus maccacae 1, poliomavirus muris 1, poliomavirus muris 2, poliomavirus papionis 1, poliomavirus, poliomavirus,

papionis, poliomavirus bovis herpesvirus 1, virus de diarrea epidémica porcina, virus de encefalomielitis hemaglutinante porcina, parvovirus porcino, virus de gastroenteritis transmisible porcina, virus porcino tipo C, virus de la viruela, poxvirus, poxvirus variolae, virus Prospect Hill, Provirus, virus pseudocowpox, virus pseudorabiospox, psittatailpox virus, psittatailpox, psittatailpox, virus virus, virus de fibroma de conejo, virus de vaculolación de riñón de conejo, virus del papiloma del conejo, virus de la rabia, parvovirus del mapache, virus de la viruela del mapache, [0001] Virus Ranikhet, citomegalovirus de rata, parvovirus de rata, virus de rata, virus de Rauscher, virus de vacuna recombinante, virus recombinante, reovirus, reovirus 1, reovirus 2, reovirus 3, virus de reptil tipo C, virus de infección respiratoria, virus sincitial respiratorio, respiratorio virus, virus de la reticuloendoteliosis, rabdovirus, rabdovirus carpiano, radinovirus, rinovirus, rizidiovirus, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de Riley, virus de la peste bovina, virus de tumor de ARN, virus del río Ross, virus del rotavirus, rougeole, virus del sarcoma de Rous, virus de la rubéola, virus de la rubeola, Rubivirus, virus de la encefalitis rusa en otoño, SA 11 virus simio, virus SA2, virus Sabia, virus Sagiyama, virus del herpes Saimirina 1,

virus de la glándula salival, grupo de virus de la fiebre de la mosca de la arena, virus Sandjimba, virus del SARS, SDAV (virus de la sialodacryoadenitis), virus de la viruela de las focas, virus de la viruela del foca, Semliki Virus del bosque, virus de Seúl, virus de la viruela ovina, virus del fibroma de Shope, virus del papiloma de Shope, virus espumoso de simio, virus de hepatitis A de simio, virus de inmunodeficiencia humana de simio, simio i virus de la inmunodeficiencia, virus de la parainfluenza de los simios, virus linfotrófico de las células T de los simios, virus de los simios, virus de los simios 40, virus simple, virus Sin Nombre, virus Sindbis, virus de la viruela, virus de la fiebre hemorrágica de América del Sur, virus de la viruela del gorrión, virus de la espuma, virus de la fibrosis ardilla, retrovirus del mono ardilla, Grupo de virus SSV 1, STLV (virus linfotrópico T simio) tipo I, STLV (virus linfotrópico T simio) tipo II, STLV (virus linfotrópico T simio) tipo III, virus de estomatitis papulosa, virus submaxilar, virus de alfaherpes suido 1, virus del herpes suido 2, Suipoxvirus, virus de la fiebre del pantano, virus de la viruela porcina, virus de la leucemia de ratón suizo, virus TAC, virus del complejo Tacaribe, virus Tacaribe, virus Tanapox, virus Taterapox, reovirus Tench, virus de la encefalomielitis de Theiler, virus de Theiler, virus de

Thogoto, virus de Thottapalayam, encefalitis transmitida por garrapatas virus, virus Tioman, Togavirus, Torovirus, virus tumoral, virus Tupaia, virus de rinotraqueitis de pavo, virus de viruela de pavo, retrovirus tipo C, oncovirus tipo D, tipo D ret grupo rovirus, rabdovirus de la enfermedad ulcerosa, virus Una, grupo del virus Uukuniemi, virus vaccinia, virus de la vacuola, virus varicela zoster, virus varicola, virus varicola, virus variola major, virus variola, virus de la enfermedad de Vasin Gishu, virus VEE, virus de la encefalitis equina venezolana, venezolano virus de la encefalomielitis equina, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la estomatitis vesicular, virus del vesiculo, virus de Vilyuisk, retrovirus de la víbora, virus de la septicemia hemorrágica viral, virus de Visna Maedi, virus de Visna, virus de la viruela del virus, VSV (virus de estomatitis vesicular), virus de la verruga, virus de la verruga virus, virus WEE, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalomielitis equina occidental, virus Whataroa, virus del vómito de invierno, virus de la hepatitis B marmota, virus del sarcoma del mono lanudo, virus del tumor de la herida, virus WRSV, virus del tumor del mono Yaba, virus Yaba, Yatapoxvirus, virus de la fiebre amarilla o el virus Yug Bogdanovac.

[0260] En algunas realizaciones, la infección patogénica es causada por un retrovirus. Los retrovirus ejemplares incluyen, pero no se limitan a, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de leucemia de células T humanas (HTLV), virus de leucemia murina de Moloney (MuLV), virus de tumor mamario murino (MMTV), leucosis aviar y virus de sarcoma, o virus del mono Mason-Pfizer.

[0261] En algunas realizaciones, un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito en este documento se administra a un sujeto con una infección retroviral o durante un período de latencia para reducir o eliminar las células infectadas que están en un período de reposo. En algunos casos, el retrovirus comprende el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de la leucemia de células T humanas (HTLV), el virus de la leucemia murina Moloney (MuLV), el virus del tumor mamario murino (MMTV), los virus de la leucosis aviar y el sarcoma, o virus del mono Mason-Pfizer. En algunos casos, el conjugado de citoquinas redirige las células T CD8+ para reconocer y eliminar las células infectadas que están en un período de reposo.

[0262] En algunos casos, el conjugado de citoquinas es un conjugado de IL-2. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto con una infección retroviral o durante un período de latencia para reducir o eliminar las

células infectadas que están en un período de reposo. En algunos casos, el retrovirus comprende el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de la leucemia de células T humanas (HTLV), el virus de la leucemia murina Moloney (MuLV), el virus del tumor mamario murino (MMTV), los virus de la leucosis aviar y el sarcoma, o virus del mono Mason-Pfizer En algunos casos, el conjugado IL-2 redirige las células T CD8+ para reconocer y eliminar las células infectadas que están en un período de reposo. En casos adicionales, el conjugado de IL-2 se administra al sujeto en combinación con una terapia antirretroviral.

[0263] En algunas realizaciones, el retrovirus es VIH. En algunos casos, un conjugado de citocinas (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito en este documento se administra a un sujeto que tiene el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o durante un período de latencia para reducir o eliminar las células infectadas por el VIH (por ejemplo, CD4+ células T) que están en un período de descanso. En algunos casos, el conjugado de citoquinas es un conjugado de IL-2. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra al sujeto en combinación con una terapia antirretroviral. La terapia antirretroviral ejemplar contra el VIH incluye:

[0264] Inhibidores de la transcriptasa inversa

nucleósidos (INTI) tales como abacavir, emtricitabina, lamivudina, tenofovir disoproxil fumarato y zidovudina;

[0265] Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI) tales como efavirenz, etravirina, nevirapina o rilpivirina;

[0266] Inhibidores de proteasa (IP) tales como atazanavir, darunavir, fosamprenavir, ritonavir, saquinavir y tipranavir;

[0267] Inhibidores de fusión tales como enfuvirtida;

[0268] Antagonistas de CCR5 tales como maraviroc;

[0269] Inhibidores de integrasa tales como dolutegravir y raltegravir;

[0270] Los inhibidores posteriores a la unión, como ibalizumab;

[0271] Potenciadores farmacocinéticos tales como ac cobicistat; y

[0272] Cócteles tales como abacavir y lamivudina; abacavir, dolutegravir y lamivudina; abacavir, lamivudina y zidovudina; atazanavir y cobicistat; bictegravir, emtricitabina y tenofovir alafenamida; darunavir y cobicistat; dolutegravir y rilpivirina; efavirenz, emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato; efavirenz, lamivudina y tenofovir disoproxil fumarato; efavirenz, lamivudina y tenofovir disoproxil fumarato; elvitegravir,

cobicistat, emtricitabina y tenofovir alafenamida fumarato; elvitegravir, cobicistat, emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato; emtricitabina, rilpivirina y tenofovir alafenamida; emtricitabina, rilpivirina y tenofovir disoproxil fumarato; emtricitabina y tenofovir alafenamida; emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato; lamivudina y tenofovir disoproxil fumarato; lamivudina y zidovudina; y lopinavir y ritonavir.

[0273] En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra al sujeto en combinación con una terapia antirretroviral tal como inhibidores nucleósidos de transcriptasa inversa (INTI) tales como abacavir, emtricitabina, lamivudina, tenofovir disoproxil fumarato y zidovudina; inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI) tales como efavirenz, etravirina, nevirapina o rilpivirina; inhibidores de proteasa (IP) tales como atazanavir, darunavir, fosamprenavir, ritonavir, saquinavir y tipranavir; inhibidores de fusión tales como enfuvirtida; Antagonistas de CCR5 tales como maraviroc; inhibidores de la integrasa tales como dolutegravir y raltegravir; inhibidores posteriores al apego tales como ibalizumab; potenciadores farmacocinéticos tales como ac cobicistat; o cócteles como abacavir y lamivudina; abacavir, dolutegravir y lamivudina; abacavir, lamivudina y zidovudina;

atazanavir y cobicistat; bictegravir, emtricitabina y tenofovir alafenamida; darunavir y cobicistat; dolutegravir y rilpivirina; efavirenz, emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato; elvitegravir, cobicistat, emtricitabina y tenofovir alafenamida fumarato; elvitegravir, cobicistat, emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato; emtricitabina, rilpivirina y tenofovir alafenamida; emtricitabina, rilpivirina y tenofovir disoproxil fumarato; emtricitabina y tenofovir alafenamida; emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato; lamivudina y tenofovir disoproxil fumarato; lamivudina y zidovudina; y lopinavir y ritonavir.

[0274] En algunas realizaciones, el virus es un virus de la hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B, C, D o E. En algunos casos, un conjugado de citocina (por ejemplo, un conjugado de IL-2) descrito en este documento se administra a un sujeto con una infección de hepatitis o durante un período de latencia para reducir o eliminar las células infectadas que están en un período de reposo. En algunos casos, el conjugado de citoquinas redirige las células T CD8+ para reconocer y eliminar las células infectadas que están en un período de reposo.

[0275] En algunos casos, el conjugado de citoquinas es un conjugado de IL-2. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra a un sujeto con una infección de hepatitis o

durante un período de latencia para reducir o eliminar las células infectadas que están en un período de reposo. En algunos casos, el conjugado IL-2 redirige las células T CD8+ para reconocer y eliminar las células infectadas que están en un período de reposo. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra al sujeto en combinación con una terapia antiviral. La terapia antiviral ejemplar para la hepatitis incluye ribavirina; Inhibidores de la proteasa NS3/4A tales como paritaprevir, simeprevir y grazoprevir; Inhibidores de la proteasa NS5A tales como ledipasvir, ombitasvir, elbasvir y daclatasvir; Inhibidores de nucleótidos/nucleósidos de NS5B y polimerasas no nucleósidos tales como sofosbuvir y dasabuvir; y combinaciones tales como ledipasvir-sofosbuvir, dasabuvir-ombitasvir-paritaprevir-ritonavir; elbasvir-grazoprevir, ombitasvir-paritaprevir-ritonavir, sofosbuvir-velpatasvir, sofosbuvir-velpatasvir-voxilaprevir y glecaprevir-pibrentasvir; e interferones tales como peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b e interferón alfa-2b. En algunos casos, el conjugado de IL-2 se administra al sujeto en combinación con una terapia antiviral como la ribavirina; Inhibidores de la proteasa NS3/4A tales como paritaprevir, simeprevir y grazoprevir; Inhibidores de la proteasa NS5A tales como ledipasvir, ombitasvir, elbasvir y daclatasvir; Inhibidores de nucleótidos/nucleósidos de NS5B y

polimerasas no nucleósidos tales como sofosbuvir y dasabuvir; y combinaciones tales como ledipasvir-sofosbuvir, dasabuvir-ombitasvir-paritaprevir-ritonavir; elbasvir-grazoprevir, ombitasvir-paritaprevir-ritonavir, sofosbuvir-velpatasvir, sofosbuvir-velpatasvir-voxilaprevir y glecaprevir-pibrentasvir; e interferones tales como peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b e interferón alfa-2b.

Métodos De Expansión De La Población De Células

[0276] En algunas realizaciones, se describen adicionalmente en el presente documento métodos para expandir poblaciones de linfocitos, por ejemplo, células auxiliares CD4+, células efectoras CD8+ y célula de memoria, células NK o células NKT, o 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 con la citocina con un receptor de citocina para formar un complejo, en donde el complejo estimula la expansión de una población de linfocitos distinta.

[0277] En algunos casos, el método para expandir una célula auxiliar CD4+, un efector ingenuo CD8+ y célula de memoria, una célula de Asesinas naturales (NK) o una célula de Asesinas naturales T (NKT) comprende poner en contacto una población de células con una IL aislada y modificada-2

polipéptido descrito anteriormente, durante un tiempo suficiente para inducir la formación de un complejo con una IL-2Rβ, estimulando así la expansión de la población de células Teff o NK. En algunos casos, el método de expandir las poblaciones de células auxiliares CD4+, CD8+ efector y célula de memoria, células NK o células NKT comprende (a) poner en contacto una población de células con un conjugado de IL-2 descrito aquí; y (b) interacción de IL-2 con las subunidades IL-2Rβ e IL-2Rγ para formar un complejo IL-2/IL-2Rβγ; en donde el conjugado de IL-2 tiene una afinidad disminuida a la subunidad IL-2Rα, y en donde el complejo IL-2/IL-2Rβγ estimula la expansión de células auxiliares CD4+, células efectoras e ingenuas CD8+ y célula de memoria, células NK o células NKT. Como se describió anteriormente, el conjugado de IL-2 comprende un polipéptido IL-2 aislado y purificado; y un residuo conjugado que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en una posición de aminoácidos seleccionada de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E60, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, M104, C105 e Y107, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de

T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, K64, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de T37, R38, T41, F42, F44, Y45, E61, E62, E68, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición de los aminoácidos se selecciona entre T37, T41, F42, F44, Y45, P65, V69, L72 e Y107. En algunos casos, la posición del aminoácido se selecciona de R38 y K64. En algunos casos, la posición de aminoácidos se selecciona de E61, E62 y E68. En algunos casos, la posición del aminoácido está en E62.

[0278] En algunas instancias, el conjugado de IL-2 expande las células T reguladoras CD4+ (Treg) en menos del 20%, 15%, 10%, 5% o 1% en la población de células. En algunos casos, el conjugado de IL-2 no expande las células Treg CD4+ en la población de células. En algunos casos, la proporción de las células Teff con las células Treg en la población de células, después de la incubación con el polipéptido IL-2 aislado y modificado es al menos 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 50: 1 o 100: 1. En algunos casos, la proporción de las células Teff con las células Treg en la población de células, después de la incubación con el polipéptido IL-2 aislado y modificado es aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 50: 1 o 100: 1.

[0279] En algunos casos, el tiempo suficiente para

inducir la formación de un complejo con una IL-2Rβ 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-2Rβ 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.

[0280] En algunos casos, el método es un método in vivo.

[0281] En algunos casos, el método es un método in vitro.

[0282] En algunos casos, el método es un método ex vivo.

Producción De Polipéptidos De Citoquinas

[0283] En algunos casos, los polipéptidos de citocinas (por ejemplo, interleucina, IFN o TNF) descritos en este documento, 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.

[0284] 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.

[0285] Las células hospedadoras ejemplares de mamífero incluyen la línea celular 293T, la línea celular 293A, la 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 celular Flp-In™-CHO, Flp-In™-CV-1 línea celular, línea celular Flp-In™-Jurkat, células FreeStile™ 293-F, células FreeStile™ 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-REx™-CHO y línea celular T-REx™-HeLa.

[0286] 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 expresSF+®.

[0287] 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.

[0288] 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.

[0289] 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™.

[0290] En algunos casos, las moléculas o vectores de ácido polinucléico 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 polinucléico 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, pBAD series de vectores, pBADM series de vectores, pET series de vectores, pETM series de vectores, pGEX series de vectores, faT, faT2, pMal-c2, pMal-p2, pQE series de vectores, 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, pFLAG CTC, o pTAC-MAT-2.

[0291] 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, pVL1393, pVL1393 M10, pVL1393 M11, pVL1393 M12, FLAG vectores tales como pPolh-FLAG1 or pPolh-MAT 2, o MAT vectores tales como pPolh-MAT1, o pPolh-MAT2.

[0292] Los vectores de levadura incluyen, por ejemplo, vector 14 Gateway® pDEST™, vector 15 Gateway® pDEST™, vector 17 Gateway® pDEST™, vector 24 Gateway® pDEST™, vector Gateway® piES-DEST52, vector de destino pBAD-DEST49 Gateway®, vector pAO815 ***Pichia***, vector pFLD1 ***Pichi pastoris***, pGAPZA, vector B, & C ***Pichia pastoris***, vector pPIC3.5K ***Pichia***, vector pPIC6 A, B, & C ***Pichia***, vector pPIC9K ***Pichia***, pTEF1/Zeo, vector de levadura piES2, vector de levadura piES2/CT, vector de levadura piES2/NT A, B, & C, o vector de levadura piES3/CT.

[0293] Los vectores de algas incluyen, por ejemplo, vector pChlamy-4 o vector MCS.

[0294] Los vectores mamíferos incluyen, por ejemplo, vectores de expresión transitoria o vectores de expresión estable. Los vectores ejemplares mamíferos, de expresión transitoria, incluyen, p3xFLAG-CMV 8, pFLAG-Myc-CMV 19, pFLAG-Myc-CMV 23, pFLAG-CMV 2, pFLAG-CMV 6a,b,c, pFLAG-CMV 5.1, 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 vectores ejemplares mamíferos, de expresión estable, incluyen, pFLAG-CMV 3, p3xFLAG-CMV 9,

p3xFLAG-CMV 13, pFLAG-Myc-CMV 21, p3xFLAG-Myc-CMV 25, pFLAG-CMV 4, p3xFLAG-CMV 10, p3xFLAG-CMV 14, pFLAG-Myc-CMV 22, p3xFLAG-Myc-CMV 26, pBICEP-CMV 1, o pBICEP-CMV 2.

[0295] 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 libre de células comprende una mezcla de componentes citoplasmáticos o nucleares de una célula y es adecuado para la síntesis in vitro de ácido nucléico. En algunos casos, un sistema libre de células utiliza componentes de células procariotas. En otros casos, un sistema libre de células utiliza componentes de células eucariotas. La síntesis de ácido nucléico 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+.

[0296] 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 los documentos: US 8,778,631; US 2017/0283469; US 2018/0051065; US 2014/0315245; o US 8,778,631. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción sin células comprenden factores de liberación modificados, o incluso la eliminación 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 sintetasas 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.

[0297] 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.

Producción De Polipéptidos De Citocinas Que Comprenden Un Aminoácido No Natural

[0298] 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 nucléico de un polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) se asignan para codificar el aminoácido no natural. que puede incorporarse genéticamente a 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.

[0299] 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.

[0300] 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., "Codificación de múltiples aminoácidos no naturales mediante la evolución de un ribosoma de decodificación cuádruple", Nature, 464 (7287): 441-444 (2010).

[0301] 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 argine codons in *Escherichia coli*," [Reglas emergentes para la elección de codones aclaradas mediante la edición de codones de arginina 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).

[0302] En algunos casos, se utilizan ácidos nucléicos 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 nucléicos 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-trifiuorometilo 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 nucléicos 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 nucléicos universales, ácidos nucléicos hidrófobos, ácidos nucléicos promiscuos, ácidos nucléicos de tamaño expandido, ácidos nucléicos fluorados, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y 0-6 purinas sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-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-halocitosina, 5-propinil (-C≡C-CH3) uracilo, 5-propinil citosina, otros derivados alquinílicos de ácidos nucléicos 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 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][l,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimid[5,4-b][l,4]benzotiazin-2(3H)-ona), G-clamps, fenoxazina citidina (*por ejemplo,* 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimid[5,4-b][l,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimid[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirid[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, azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina, citosina

clorada, ciclocitosina, arabinósido de citosina, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, fluorouracilo, 5,6-dihidrocitosina, 5-yodocitosina, hidroxiurea, yodouracilo, 5-nitrocitosina, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo y 5-yodouracilo, 2-yodouracilo, 2-yodouracilo, 2-yodouracilo, 2-yodouracilo, 2-yodouracilo 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-hidroxicitosina, 2'-desoxiuridina, 2-amino-2'-desoxiadenosina, y los descritos en las patentes de EE. UU. No.: 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 y 6,005,096; WO 99/62923; Kandimalla et al., (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858- 859; Englisch et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y Sanghvi, Capítulo 15, [Investigación y aplicaciones antisentido] Antisense Research and Applications, Crookeand 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 et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y Sanghvi, Capítulo 15, Antisense Research y Applications Investigación y aplicaciones antisentido], páginas 289-302, Crooke y Lebleu ed., CRC Press, 1993.

[0303] Los ácidos nucléicos no naturales que comprenden diversas bases heterocíclicas y diversos residuos de azúcar (y análogos de azúcar) están disponibles en la técnica, y los ácidos nucléicos en algunos casos incluyen una o varias bases heterocíclicas distintas de los cinco componentes principales de los ácidos nucléicos naturales. Por ejemplo, la base heterocíclica incluye, en algunos casos, los grupos uracil-5-il, citosin-5-il, adenin-7-il, adenin-8-il, guanin-7-il, guanin-8-il, 4-aminopirrolo [2.3-d] pirimidin-5-il, 2-amino-4-oxopirolo [2, 3-d] pirimidin-5-il, 2-amino-4-oxopirrolo [2.3-d] pirimidin-3-il, donde las purinas están unidas al residuo de azúcar del ácido nucléico a través de la posición 9, las pirimidinas a través de la posición 1, las pirrolopirimidinas a través de la posición 7 y las pirazolopirimidinas a través de la posición 1.

[0304] En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos también se modifican en el residuo fosfato. Los residuos de fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, aquellos con modificación en el enlace entre dos

nucleótidos y contienen, por ejemplo, un fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, metilo y otros alquilfosfonatos incluyendo fosfonato de 3'-alquileno y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriesters y boranofosfates. Se entiende que estos enlaces fosfato o fosfato modificado entre dos 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 fabricar y usar nucleótidos que contienen fosfatos modificados e incluyen, entre otros, los números: 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; 5,466,677; 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.

[0305] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales incluyen 2',3'-dideoxi-2',3'-didehidro-nucleósidos (PCT/US2002/006460), 5'-derivados sustituidos de

ADN y ARN (PCT/US2011/033961; Saha et al., J. Org Chem., 1995, 60, 788-789; Wang et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters [Cartas de Química Bioorgánica y Medicinal], 1999, 9, 885-890; y Mikhailov et al., Nucleosides & Nucleotides [Nucleósidos y nucleótidos], 1991, 10(1-3), 339-343; Leonid et al., 1995, 14(3-5), 901-905; y Eppacher et al., Helvetica Chimica Acta [Acta Química Helvética], 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'-sustituidos monomers made as the monofosfate con modified bases [5'- monómeros sustituidos hechos como el monofosfato con bases modificadas] (Wang et al., Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids [Nucleótidos Nucleósidos y Ácidos Nucléicos], 2004, 23 (1 & 2), 317-337).

[0306] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales incluyen modificaciones en la 5'-posición y la 2'-posición en el anillo de azúcar (PCT/US94/02993), tales como, 5'-CH_2-sustituidos 2'-O-nucleósidos protegidos (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 oligonucleótidos en los que el nucleósido unido a 3' en el

dímero (5′ a 3′) comprende un 2′-OCH_3 y un 5′-(S)-CH_3 (Mesmaeker et al., Synlett, 1997, 1287-1290). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir 2′-sustituidos 5′-CH_2 (o O) nucleósidos modificados (PCT/US92/01020). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir 5′-metilenofosfonato Monómeros de ADN y ARN, y dímeros (Bohringer et al., Tet. Lett., 1993, 34, 2723-2726; Collingwood et al., Synlett, 1995, 7, 703-705; y Hutter et al., Helvetica Chimica Acta, 2002, 85, 2777-2806). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros de 5′-fosfonato teniendo una 2′-sustitución (US2006/0074035) y otros monómeros modificados de 5′-fosfonato (WO1997/35869). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir 5′-monómeros de metilenofosfonato modificados (EP614907 y EP629633). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir análogos de 5′ o 6′-ribonucleósidos de fosfonato que comprenden un grupo hidroxilo en la 5′ o 6′-posición (Chen et al., Fosforus, Sulfur y Silicon, 2002, 777, 1783-1786; Jung et al., Bioorg. Med. Chem., 2000, 8, 2501-2509; Gallier et al., Eur. J. Org. Chem., 2007, 925-933; y Hampton et al., J. Med. Chem., 1976, 19(8), 1029-1033). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir 5′-fosfonato monómeros de deoxirribonucleósidos y dímeros teniendo un 5′-grupo fosfato (Nawrot et al., Oligonucleotides, 2006, 16(1), 68-82). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir

nucleósidos teniendo un 6'-grupo fosfonato donde la 5' o 6'-posición está no sustituida o sustituida con un grupo tio-terc-butil ($SC(CH_3)_3$) (y análogos de los mismos); un grupo metilenoamino (CH_2NH_2) (y análogos de los mismos) o un grupo ciano (CN) (y análogos de los mismos) (Fairhurst et al., Synlett, 2001, 4, 467-472; Kappler et al., 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).

[0307] En algunas realizaciones, los ácidos nucléicos no naturales también incluyen modificaciones del residuo azúcar. En algunos casos, los ácidos nucléicos 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 nucléicos comprenden un residuo de anillo de ribofuranosa modificado químicamente. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa 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

nucléicos bicíclicos (BNA); reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con alquilo S, N(R), or $C(R_1)(R_2)$ (R = H, C_1-C_{12} o un grupo protector), y combinaciones de los mismos. Pueden encontrarse ejemplos de azúcares modificados químicamente en WO2008/101157, US2005/0130923, y WO2007/134181.

[0308] En algunos casos, un ácido nucléico 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 furanosido 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 nucléico). Las modificaciones de azúcar también se pueden hacer y combinar con otras modificaciones.

[0309] Las modificaciones al residuo de azúcar incluyen modificaciones naturales de la ribosa y desoxi ribosa, así como modificaciones no naturales. Las modificaciones a los residuos de azúcar incluyen, entre otras, las siguientes, en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquil; O-, S-, o N-alquenil; O-, S-or N-alquinil; or O-alquil-O-alquil, en donde el alquil, alquenil y alquinil pueden estar sustituidos o no sustituidos C_1 a C_{10}, alquil o C_2 a C_{10} alquenil y alquinil. Las modificaciones en el azúcar 2' también incluyen, pero no se limitan a, $-O[(CH_2)_nO]_m$ CH_3,$-O(CH_2)_nOCH_3$,$-O(CH_2)_nNH_2$,$-O(CH_2)_nCH_3$,$-O(CH_2)_nONH_2$, y $-O(CH_2)_nON[(CH_2)n\ CH_3)]_2$, donde n y m son de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.

[0310] Otras modificaciones en la posición 2' incluyen, pero no se limitan a: C_1 a C_{10} alquil bajo, alquil bajo sustituido, alcaril, aralquil, O-alcaril, O-aralquil, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2 CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, 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 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 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 pentofuranosilo. Existen numerosas patentes de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas y que detallan y describen una gama de modificaciones de bases, tales como las patentes EE. UU. 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; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; y 5,700,920, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su

totalidad.

[0311] Los ejemplos de ácidos nucléicos que tienen residuos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, ácidos nucléicos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinil, 5'-metil (R or S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH_3, y 2'-$O(CH_2)_2OCH_3$. Los sustituyentes en la posición 2' pueden también ser seleccionados de alil, amino, azido, tio, O-alil, O-(C_1-C_{10} alquil), OCF_3, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2$-O-$N(R_m)(R_n)$, y O-CH_2-C(=O)-$N(R_m)(R_n)$, en donde cada R_m y R_n is, independientemente, H o C_1-C_{10} alquil sustituidos o no sustituidos.

[0312] En ciertas realizaciones, los ácidos nucléicos descritos en el presente documento incluyen uno o más ácidos nucléicos bicíclicos. En ciertas realizaciones de este tipo, el ácido nucléico bicíclico comprende un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los ácidos nucléicos proporcionados en el presente documento incluyen uno o más ácidos nucléicos bicíclicos en los que el puente comprende un ácido nucléico bicíclico de 4' a 2'. Los ejemplos de dichos ácidos nucléicos bicíclicos de 4' a 2' incluyen, entre otros, una de las fórmulas: 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-$(CH_2)_2$-O-2' (ENA); 4'-$CH(CH_3)$-O-2' y 4'-$CH(CH_2OCH_3)$-O-2', y análogos de los mismos (ver, la patente de EE. UU. No. 7,399,845); 4'-$C(CH_3)(CH_3)$-O-2' y análogos de

los mismos, (ver WO2009/006478, WO2008/150729, US2004/0171570, Patente de EE. UU. 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, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Oram et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Patentes de EE. UU. 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; 7,034,133; 6,525,191; 6,670,461; y 7,399,845; las Publicaciones Internacionales Nos. WO2004/106356, WO1994/14226, WO2005/021570, WO2007/090071, y WO2007/134181; Patentes de EE. UU. Publication Nos. US2004/0171570, US2007/0287831, y US2008/0039618; Solicitudes Provisionales de los EE. UU. Nos. 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, y 61/099,844; e Solicitudes Internacionales Nos. PCT/US2008/064591, PCT US2008/066154, PCT US2008/068922, y PCT/DK98/00393.

[0313] En ciertas realizaciones, los ácidos nucléicos

comprenden ácidos nucléicos unidos. Los ácidos nucléicos pueden unirse entre sí utilizando cualquier enlace de ácido nucléico inter. Las dos clases principales de grupos de enlace de ácido inter nucléico se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces representativos de ácido nucléico que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos (P=S). Los grupos de enlace de ácido inter nucléico representativos que no contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, metilenometilimino ($-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(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 nucléicos que tienen un átomo quiral se pueden preparar como una mezcla racémica, como enantiómeros separados, por ejemplo, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los ácidos nucléicos no naturales pueden contener una sola modificación. Los ácidos nucléicos no naturales pueden contener múltiples modificaciones dentro de uno de los residuos o entre diferentes residuos.

[0314] 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.

[0315] 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.

[0316] 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. 24: 1841-1848; Chaturvedi et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24: 2318-2323; y Schultz et al., (1996) Nucleic Acids Res. 24: 2966-2973; Matteucci, 1997, "Oligonucleotide Análogos: an Overview" [Análogos de oligonucleótidos: una visión general] en Oligoneucleotides as Therapeutic Agents [Oligonucleótidos como agentes terapéuticos], (Chadwick y Cardew, ed.) John Wiley y Sons, Nueva York, NY; Zon, 1993, "Oligonucleoside Fosforotioates"

[Fosforotioatos de oligonucleótidos] en Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties [Protocolos Para Oligonucleótidos Y Análogos, Síntesis Y Propiedades], Humana Press, pp. 165-190; Miller et al., 1971, JACS 93: 6657-6665; Jager y col., 1988, Biochem. 27: 7247-7246; Nelson et al., 1997, JOC 62:7278-7287; Patente de Estados Unidos No. 5,453,496; y Micklefield, 2001, Curr. Medicina. Chem 8:1157-1179.

[0317] 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; esqueletos que contienen grupos sulfonilo; oligos morfolino; ácidos nucléicos peptídicos (PNA); y oligos de guanidina desoxirribonucleica cargada positivamente (DNG) (Micklefield, 2001, Current Medicinal Chemistry 8: 1157-1179). Un ácido nucléico modificado puede comprender una cadena principal quimérica o mixta que comprende una o más modificaciones, por ejemplo, una combinación de enlaces de fosfato tales como una

combinación de enlaces de fosfodiéster y fosforotioato.

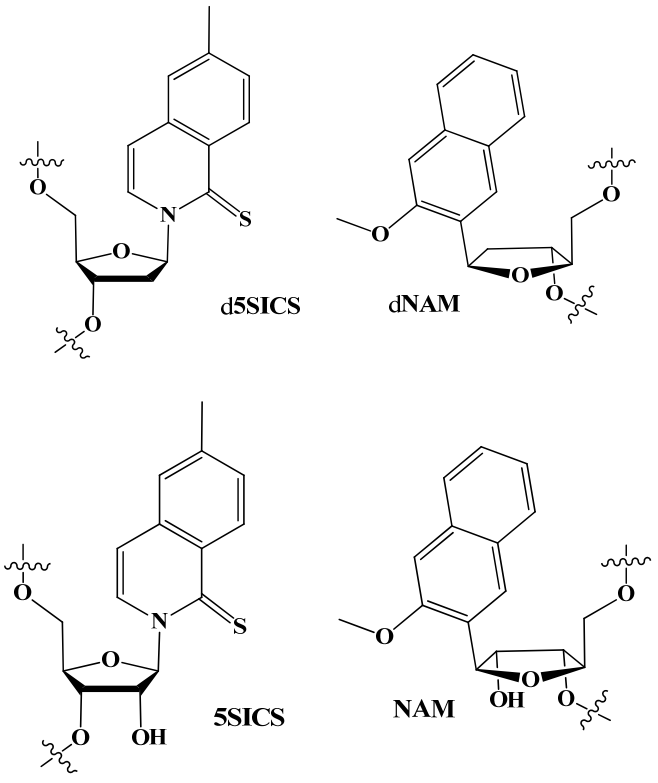
[0318] Los sustitutos para el fosfato incluyen, por ejemplo, enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetil y tioformacetil; esqueletos de metileno formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alquenos; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; amida columna vertebral; y otros que tienen componentes mixtos de N, O, S y CH_2. Numerosas patentes de los Estados Unidos revelan cómo hacer y usar estos tipos de reemplazos de fosfato e incluyen, entre otros, las patentes de EE. UU. Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; y 5,677,439. 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 tipo amida (aminoetilglicina) (PNA). Patentes de los Estados Unidos Nos. 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 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 de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 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. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EM5OJ, 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, di-hexadecil-rac-glicerol o

trietilamonio l-di-O-hexadecil-rac-glicero-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., Nucleósidos & Nucleotides, 19 95, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un residuo palmitil (Mishra et al., Biochem. Biophys Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicocolesterol (Crooke et al., J. Farmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan la preparación de tales conjugados e incluyen, entre otros, las patentes de EE. UU. No. 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; 5,082,830; 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; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y

5,688,941.

[0319] En algunos casos, los ácidos nucléicos 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:



[0320] 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-Expansión de la química en biología], Chemical Science, 6: 50-69 (2015).

[0321] La célula huésped en la que se introducen los constructos o los vectores descritos en este documento se cultiva o mantiene en un medio adecuado de manera 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).

[0322] El par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal carga un ARNt con un aminoácido no natural e incorpora el aminoácido no natural en la cadena de polipéptidos en respuesta al codón. Los ejemplos de pares de aaRS-ARNt incluyen, entre otros, pares de aaRS/ARNt de Metanococcus jannaschii (Mj-Tir), E. coli TirRS (Ec-Tir)/B. pares de ARNtCUA stearothermophilus, E. coli LeuRS (Ec-Leu)/B. stearothermophilus pares de ARNtCUA y pares de pirrolisil-ARNt.

[0323] Un polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) que comprende uno o más aminoácidos no naturales se prepara introduciendo los constructos de ácido nucléico descritas en el presente documento que comprenden la ARNt y la ARNt sintetasa y que comprenden una secuencia de ácido nucléico de interés con uno o más en estructuras 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 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 incorporar dos o más aminoácidos no naturales en el polipéptido de citocina (por ejemplo, IL-2) en dos o más sitios en la proteína.

[0324] 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 modo 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.

[0325] 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 par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal adicional 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.

[0326] 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, se puede extraer 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 técnica adecuada.

[0327] 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 melanogaster), células de levadura, nematodos (por ejemplo, Celegans), 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 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.

[0328] Otras células huésped adecuadas que pueden usarse 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. precipitación, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped son bien conocidos en la técnica.

[0329] Cuando se crean líneas celulares, generalmente se 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 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 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).

[0330] En una realización, los constructos descritos 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 puede llevarse a cabo. Por consiguiente, es deseable crear líneas celulares estables. En otra realización, los

constructos descritos en el presente documento se transfectan en una célula huésped. Una ventaja de transfectar los constructos en la célula huésped es que se pueden 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

[0331] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica y las formulaciones descritas en el presente documento se administran a un sujeto mediante múltiples rutas de administración, que incluyen, pero no se limitan a, rutas de administración parenteral, oral, bucal, rectal, sublingual o transdérmica. En algunos casos, la administración parenteral comprende la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracerebral, intranasal, intraarterial, intraarticular, intradérmica, intravítrea, intraósea, intraperitoneal o intratecal. En algunos casos, la composición farmacéutica está formulada para la administración local. En otros casos, la composición farmacéutica está formulada para administración sistémica.

[0332] En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen, entre otras, dispersiones líquidas acuosas, dispersiones autoemulsionantes, soluciones sólidas, dispersiones liposomales, aerosoles, formas de dosificación

sólidas, polvos, formulaciones de liberación inmediata, formulaciones de liberación controlada, rápido formulaciones fundidas, tabletas, cápsulas, píldoras, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación pulsátil, formulaciones multiparticuladas (por ejemplo, formulaciones de nanopartículas) y formulaciones mixtas de liberación inmediata y controlada.

[0333] En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen un vehículo o materiales de vehículo seleccionados en base a la compatibilidad con la composición descrita en el presente documento, y las propiedades del perfil de liberación de la forma de dosificación deseada. Los materiales de soporte ejemplares incluyen, por ejemplo, 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. Véase, por ejemplo, ***Remington: The Science and Practice of Pharmacy***, Decimonovena Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995), Hoover, John E., ***Remington's Pharmaceutical Sciences***, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975, Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., ***Pharmaceutical Dosage Forms***, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980, y ***Pharmaceutical Dosage Fo***rms ***and*** Drug Delivery Systems, Séptima Ed. (Lippincott Williams & Wilkins1999).

[0334] 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; esteroles tales como colesteroles; esfingolípidos tales como esfingomielina; glicoesfingolípidos 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"), fosfatidilcolina ("PC"), fosfatidilglicerol ("PG"),

fosfatidiletanolamina ("PE"), fosfatidilinositol ("PI") y fosfatidilserina ("PS"), esfingomielina (incluida la esfingomielina), lecitina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, cerebrósidos, diaraquidoilfosfatidilcolina ("DAPC"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilcolina ("DDPC"), dielaidoilfosfatidilcolina ("DEPC"), dilauroilfosfatidilcolina ("DLPC"), dilinoleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"), dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), diestearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina ("POPC"), diaraquidoilfosfatidilglicerol ("DAPG"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilglicerol ("DDPG"), dielaidoilfosfatidilglicerol ("DEPG"), dilauroilfosfatidilglicerol ("DLPG"), dilinoleoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol (“DMPG”), dioleoilfosfatidilglicerol (“DOPG”), dipalmitoilfosfatidilglicerol (“DPPG”), diestearoilfosfatidilglicerol (“DSPG”), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol ("POPG"), diaraquidoilfosfatidiletanolamina ("DAPE"), didecanoil-L-alfa-fosfatidiletanolamina ("DDPE"), dielaidoilfosfatidiletanolamina ("DEPE"), dilauroilfosfatidiletanolamina (“DLPE”),

dilinoleoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidiletanolamina (“DMPE”), dioleoilfosfatidiletanolamina (“DOPE”), dipalmitoilfosfatidilano (“DPPE”), diestearoilfosfatidiletanolamina ("DSPE"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina ("POPE"), diaraquidoilfosfatidilinositol ("DAPI"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilinositol ("DDPI"), dielaidoilfosfatidilinositol (“DEPI”), dilauroilfosfatidilinositol (“DLPI”), dilinoleoilfosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilinositol (“DMPI”), dioleoilfosfatidilinositol ("DOPI"), dipalmitoilfosfatidilinositol ("DPPI"), diestearoilfosfatidilinositol ("DSPI"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilinositol ("POPI"), diaraquidoilfosfatidilserina ("DAPS"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilserina ("DDPS"), dielaidoilfosfatidilserina ("DEPS"), dilauroilfosfatidilserina ("DLPS"), dilinoleoilfosfatidilserina, dimiristoilfosfatidilserina ("DMPS"), dioleoilfosfatidilserina ("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 esfingomielina, dipalmitoil esfingomielina, diestearoil esfingomielina y 1-palmitoil-2-oleoil-esfingomielina.

[0335] En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas incluyen además agentes de ajuste de pH o agentes tamponantes que incluyen ácidos tales como ácidos acético, bórico, 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, bases y tampones se incluyen en una cantidad requerida para mantener el pH de la composición en un rango aceptable.

[0336] 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 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.

[0337] 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.

[0338] 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 hidrolizados, amilosa, polvo de celulosa, carbonato de calcio, glicina, caolín, manitol, cloruro de sodio, inositol, bentonita y similares.

[0339] En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas incluyen agentes de desintegración o desintegrantes para 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 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® 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), 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 combinado, y similares.

[0340] 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 celulosa, dextrosa, dextratos, dextrano, almidones, almidón pregelatinizado, sacarosa, xilitol, lactitol, manitol, sorbitol, cloruro de sodio, polietilenglicol y similares.

[0341] Los lubricantes y deslizantes también se incluyen opcionalmente en las formulaciones farmacéuticas descritas 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 Siloid™, Cab-O-Sil®, un almidón como el almidón de maíz, aceite de silicona, un tensioactivo y similares.

[0342] Los plastificantes incluyen compuestos utilizados para ablandar el material de microencapsulación o 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.

[0343] Los solubilizantes incluyen compuestos tales como triacetina, citrato de trietilo, oleato de etilo, acetato de caprilato, sodio lauril sulfato, doccusato de sodio, la 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, transcutol, propilenglicol y dimetil isosorbida y similares.

[0344] Los estabilizadores incluyen compuestos tales como cualquier agente antioxidante, tampones, ácidos, conservantes y similares. Los estabilizadores ejemplares incluyen clorhidrato de L-arginina, trometamina, albúmina (humana), ácido cítrico, alcohol bencílico, fenol, bifosfato disódico deshidratado, propilenglicol, metacresol o m-cresol, acetato de zinc, polisorbato-20 o Tween® 20, o trometamol.

[0345] Los agentes de suspensión incluyen compuestos tales como polivinilpirrolidona, por ejemplo, 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 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, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polisorbato-80, alginato de sodio, polietoxilado de sorbitán, monoleato de sorbitán, monoleato de sorbitán y monoleato de sorbitán, monoleato de sorbitán similares.

[0346] Los tensioactivos incluyen compuestos tales como laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, Tween 60 u 80, triacetina, vitamina E TPGS, monooleato de sorbitano, monooleato de polioxietilen sorbitano, polisorbatos, polaxómeros, sales biliares, monoestearato de glicerilo, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno., por ejemplo, Pluronic® (BASF), y similares. Los tensioactivos 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 incluyen para mejorar la estabilidad física o para otros fines.

[0347] Los agentes potenciadores de la viscosidad incluyen, por ejemplo, metilcelulosa, goma de xantano,

carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, acetato de hidroxipropilmetil celulosa estearato, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, carbómero, alcohol polivinílico, alginatos, acacias, quitosanos y combinaciones de los mismos.

[0348] Los agentes humectantes incluyen compuestos tales como ácido oleico, monoestearato de glicerilo, monooleato de sorbitano, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, monooleato de polioxietilen sorbitano, docusato de sodio, oleato de sodio, lauril sulfato de sodio, tricetinato de sodio, doccusato de sodio, tricetinato de sodio vitamina E TPGS, sales de amonio y similares.

Regímenes Terapéuticos

[0349] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en este 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 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.

[0350] En el caso en donde el estado del paciente mejora, a discreción del médico, la administración de la composición se administra continuamente, alternativamente, la dosis de la composición que se administra se reduce temporalmente o se suspende temporalmente durante un cierto período de tiempo (es decir, una "fiesta de drogas"). En algunos casos, la duración de las vacaciones de drogas 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 drogas 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%.

[0351] Una vez que se ha producido la 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.

[0352] En algunas realizaciones, la cantidad de un agente dado que corresponde a tal 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 embargo se determina rutinariamente 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 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.

[0353] 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 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.

[0354] 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

[0355] En el presente documento, en ciertas realizaciones, se encuentran 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 tubos de ensayo. En una realización, los contenedores están formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

[0356] Los artículos de fabricación proporcionados en este documento contienen materiales de embalaje. Los ejemplos 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.

[0357] 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 aquí para facilitar el suministro de 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.

[0358] 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.

[0359] En una realización, una etiqueta está en o asociada con el contenedor. 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 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 también indica instrucciones para el uso de los contenidos, como en los métodos descritos en este documento.

[0360] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se presentan en un paquete o dispositivo dispensador que contiene una o más formas de dosificación 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 Drogas 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

[0361] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este 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", "incluye" e "incluido", no es limitante.

[0362] Aunque pueden describirse diversas características de la invención en el contexto de una sola realización, las características también pueden proporcionarse 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.

[0363] 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.

[0364] Como se usa en el presente documento, los intervalos y cantidades pueden expresarse como "aproximadamente" un valor o intervalo particular. Acerca de

también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, “aproximadamente 5 µL” significa “aproximadamente 5 µL” y también “5 µL”. Generalmente, el término “aproximadamente” incluye una cantidad que se esperaría que estuviera dentro del error experimental, como, por ejemplo, dentro del 15%, 10% o 5%.

[0365] Los encabezados de sección utilizados en este documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

[0366] Como se usa en este 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).

[0367] 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.

[0368] 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 citoquinas significa un cambio suficiente para activar la población de células. En algunos casos, el cambio para activar la población de células 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.

[0369] 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 requerida para producir el efecto objetivo en el 50% de la población.

Ejemplos

[0370] Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no para limitar el alcance de las reivindicaciones proporcionadas en el presente documento.

Ejemplo 1

[0371] **Ensayos De Dimerización Del Receptor De Quinasas Y Citoquinas**

[0372] **Manejo De Células**

[0373] Las líneas celulares de 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.

[0374] **Formato Agonista**

[0375] 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%.

[0376] **Detección De Señal**

[0377] 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 agonistas y antagonistas respectivamente, seguido de una incubación de una hora a temperatura ambiente. Para algunos ensayos, la actividad se 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 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.

[0378] **Análisis De Datos**

[0379] La actividad del compuesto se analizó usando el conjunto de análisis de datos CBIS (ChemInnovation, CA). Para

los ensayos en modo agonista, el porcentaje de actividad se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de 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).

[0380] Para los ensayos en modo antagonista, se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula: % de inhibición= 100% x (1-(RLU media de la muestra de prueba-RLU media del control del vehículo)/(RLU media del control EC80-RLU media del control del vehículo)).

Ejemplo 2

[0381] **Detección Basada En Células Para La Identificación De Compuestos De IL-2 Pegilados Sin Comprometer IL-2Rα**

[0382] Los datos estructurales del complejo de señalización del receptor de IL-2/heterotrimérico (PDB: 2ERJ) se usaron para guiar el diseño de sitios de pegilación nAA para anular específicamente la interacción de la subunidad α del receptor de IL-2 e IL-2 (IL-2Rα). Los conjugados ejemplares de IL-2 se sometieron a análisis funcional: K35, F42, K43, E62 y P65. Los conjugados de IL-2 se expresaron como cuerpos de inclusión en E. coli, se purificaron y se volvieron a plegar usando procedimientos estándar antes de pegilar específicamente en el sitio el producto de IL-2 usando

química de clic sin cobre mediada por DBCO para unir mPEG covalentes estables a el AzK.

[0383] Los conjugados de IL-2 se seleccionaron para determinar su actividad funcional en Discoverx (Fremont CA) usando el ensayo del receptor de citocinas IL-2 de PathHunter. Este ensayo utiliza la línea celular humana recombinante U2OS que expresa las subunidades del receptor de IL-2 β (IL-2Rβ) y γ (IL-2Rγ), cada una fusionada a la mitad de la enzima informadora dividida β-galactosidasa. Una segunda línea celular ha sido diseñada para expresar la subunidad IL-2Rα□. Las pruebas paralelas con estas dos líneas celulares permiten evaluar la activación variante del receptor de IL-2 βγ, así como del complejo basal βγ. La actividad agonista de IL-2 en el complejo del receptor βγ de IL-2 estimula la dimerización del receptor y la reconstitución de la β-galactosidasa informadora que produce una señal quimioluminiscente. El ensayo se realizó en modo agonista para determinar la CE_{50} de cada artículo de prueba, y la comparación de los perfiles de curva de dosis-respuesta entre los tipos de células positivas y negativas para IL2Rα permite determinar la contribución de IL2Rα a la actividad observada.

[0384] La Tabla 1 muestra los datos de EC_{50} para el agonismo del receptor de IL-2 en un cribado basado en células para conjugados de IL-2 PEGilados a 30 kD.

Sitio	βγ EC50 (nM)	αβγ EC50 (nM)	Relación βγ/αβγ
Nativo	1.68	0.074	23
K35	6.75	0.15	45
F42	6.09	0.515	12
K43	9.84	0.131	75
E62	3	1.5	2
P65	23.8	4.44	5

[0385] **Interacciones Bioquímicas De IL-2 PEGilada Con Subunidades De Receptor De IL-2 Humano**

[0386] La cinética de las interacciones del compuesto IL-2 PEGilado con las subunidades del receptor de IL-2 humano se midió usando la Resonancia de Plasma de Superficie (SPR) en Biosensor Tools LLC (Salt Lake City, UT). Para estos estudios, se capturaron dominios extracelulares de IL-2 Rα (Sino Biological #10165-H02H) y β (Sino Biological #10696-H02H) humanos fusionados con IgG1 Fc en la superficie de un chip sensor CM4 recubierto con proteína Biacore. Estas superficies se sondearon por duplicado, con series de dilución doble a partir de 2 µM de IL-2 nativa (IL-2 tipo salvaje; Thermo #PHC0021), P65_30kD, P65_5kD, E62_30kD o E62_5kD utilizando un instrumento Biacore 2000 SPR. Las muestras de prueba se inyectaron durante 60 s para permitir

la medición de la asociación, seguido de tampón solo (lavado) durante 30 s para medir la disociación. Las unidades de respuesta (RU, eje Y) se representan gráficamente frente al tiempo (s, eje X).

[0387] Para evaluar el efecto de la subunidad α del receptor de IL-2 sobre la unión de IL-2 a β, se capturó α en un exceso de aproximadamente dos veces con respecto a β. A estas superficies, se aplicaron IL-2 nativa (IL-2 tipo salvaje), P65_30kD, P65_5kD, E62_30kD o E62_5kD en una serie de dilución triple que comienza a 2.5 µM. Los datos de unión se ajustaron a un modelo de interacción 1: 1 que incluía un desplazamiento masivo, y los parámetros cinéticos extraídos se resumen en la Tabla 2A y la Tabla 2B.

Tabla 2A: Parámetros Cinéticos Para Interacciones Variantes De IL-2 Con Superficies Individuales De Subunidad De Receptor De IL-2-Superficie A Del Receptor De IL-2

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (µM)
IL-2 nativo	4.5 ±0.3 x10^7	0.410 ±0.01	0.009 ±0.002
P65_30kD	114 ±36	0.018 ±0.008	158 ±21
P65_5kD	797 ±226	0.033 ±0.004	42 ±7
E62_30kD	333 ±88	0.050 ±0.01	162 ±7
E62_5kD	1010 ±41	0.035 ±0.002	34.4 ±0.3

Tabla 2B: Parámetros Cinéticos Para Las Interacciones Variantes De IL-2 Con Superficies De Subunidades De Receptor De IL-2 Individuales-Superficie B Del Receptor De IL-2

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
IL-2 nativo	1.3 ±0.2 x10^6	0.185 ±0.009	0.145 ±0.005
P65_30kD	1.8 ±0.2 x10^5	0.370 ±0.01	2.09 ±0.09
P65_5kD	9.0 ±0.4 x10^5	0.270 ±0.01	0.305 ±0.002
E62_30kD	1.8 ±0.4 x10^5	0.208 ±0.006	1.14 ±0.01
E62_5kD	6.6 ±0.8 x10^5	0.281 ±0.004	0.428 ±0.00

[0388] En las superficies del sensor que contienen IL-2Rα inmovilizada, la IL-2 nativa mostró una asociación rápida y una cinética de disociación lenta, demostrando una unión de alta afinidad (Figura 4A). En contraste, ni P65_30kD ni E62_30kD interactúan con la superficie de IL-2Rα incluso a la concentración de prueba más alta de 2 μM (Figura 4A). Las superficies que contenían IL-2 Rβ inmovilizado mostraron respuestas de asociación y disociación comparables tanto con IL-2 nativa (IL-2 tipo salvaje) como con IL-2 P65_30kD (Figura 4B). La modesta diferencia en KD observada entre los compuestos para la subunidad β□ se debe a la disminución de la tasa de activación de IL-2 P65_30kD con respecto a la IL-2 nativa, esperada por el cambio en el radio hidrodinámico de este compuesto pegilado (coeficiente de difusión más bajo) así como efectos de protección no específicos del residuo PEG grande en superficies de unión distantes. Estos resultados sugieren que P65_30kD y E62_30kD son defectuosos en las

interacciones de IL-2Rα mientras que retienen en gran medida la unión a IL-2Rβ.

[0389] **Perfil De Respuesta Inmune Ex Vivo De IL-2 P65_30kd Y E62 Kd En Muestras De PBMC Derivadas Del Sistema De Reducción De Leucocitos Humanos Primarios (LRS)**

[0390] Para determinar cómo la especificidad diferencial del receptor de IL-2 P65_30kD y E62_30kD afecta la activación de subpoblaciones de células inmunes primarias, se realizó un perfil de respuesta de concentración de activación de linfocitos en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de LRS humanas usando múltiples citometría de flujo de color. Estos estudios se realizaron en PrimityBio LLC (Fremont, CA). Las muestras frescas derivadas de LRS se trataron con IL-2 nativa, P65_30kD o E62_30kD en series de dilución de 5 veces comenzando con una concentración máxima de 30 µg/ml. Después de una incubación de 45 minutos, las muestras se fijaron y se tiñeron con anticuerpos para detectar la forma fosforilada del factor de transcripción STAT5 (pSTAT5), un marcador de activación y activación aguas arriba de los complejos de señalización del receptor de IL-2 y un panel de marcadores de superficie (Tabla 3) para seguir la formación de pSTAT5 en subpoblaciones específicas de células T y asesinas naturales (NK).

Tabla 3: Panel De Tinción Para El Estudio De Citometría De Flujo De Muestras De PBMC Derivadas De LRS

Tipo de célula	Perfil del marcador
Células T efectoras (Teff)	CD3+, CD4+, CD8+, CD127+
Células NK	CD3-, CD16+
Células T regulatorias (Treg)	CD3+, CD4+, CD8-, IL-2Rα+, CD127-

[0391] 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 IL-2 nativa (Figura 5A), E62_30kD (Figura 5B) y P65_30kD (Figura. 5C). En las poblaciones de células T NK y efectoras (CD3+ CD8+), IL-2 P65_30kD e IL-2 E62_30kD retuvieron la potencia en relación con la IL-2 nativa, con valores de CE50 para la producción de pSTAT5 dentro de 4-5 veces de IL-2 nativa (Figura. 5A). Por el contrario, los valores de CE50 para la inducción de pSTAT5 para IL-2 P65_30kD en la subpoblación de Treg (CD3+ CD4+ IL-2Rα+ CD127-) se redujo en 900 veces en comparación con la IL-2 nativa, pero se mantuvo similar a la CE50 para NK y poblaciones de células Teff (Figura 5C). Este aumento sustancial en la CE50 para IL-2 P65_30kD específicamente en la población Treg indica que la pegilación de IL-2 en estas posiciones permite el agonismo de los receptores de IL-2, pero elimina el sesgo de IL-2 para la estimulación de Treg en relación con las células T efectoras.

Tabla 4. Respuesta De Dosis EC50 Para La Señalización De Pstat5 (EC50) En Muestras De LRS Humanas O Proliferación De CTLL-2 Tratada Con La Variante De IL-2 Indicada

Tratamiento	Células NK	Células Treg	Células T CD8+	Relación CD8/Treg	CTLL-2
Nativas IL-2	5150.5	62.5	25703.5	411.3	846
E62_30kD	12834	37213	66644	1.8	398,012
E62_5kD	5327.5	18146	41552.5	2.3	275,590
E62K	10305	11086	64037	5.8	58,213
P65_30kD	15741	40740.5	113638	2.8	677,198
P65_5kD	1920	6324.5	13769.5	2.2	194,924
K35_30kD	14021	358	63023	176.0	N.D.
F42_30kD	16397	36856	107944	2.9	123,936
K43_30kD	9004	4797	50504	10.5	N.D.

[0392] Los valores de CE50 (pg/ml) se calcularon a partir de las curvas de respuesta a las dosis generadas a partir de gráficos MFI.

Ejemplo 3

[0393] **Estudios De PK/PD En Ratones Tiernos (E3826-U1704) Y B16-F10 Portadores De Tumor (E3826-U1803) C57BL/6**

[0394] Los diseños de estudio se resumen en las Tablas 5 y 6. Se recogieron muestras de sangre terminal mediante punción cardíaca en los puntos indicados. El estudio E3826-U1704, incluyó 13 puntos de tiempo (0.13, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h) sacrificando 3 ratones por cada punto de tiempo y el estudio E3826-U1803 incluido 9 puntos de tiempo (2, 8, 12, 24, 48, 72, 120, 168 y 240 h) sacrificando 4-7 ratones por cada punto de tiempo. Se recogieron plasma y

células sanguíneas (en ambos estudios) y tumores en el estudio E3826-U1803 para análisis PK y PD.

[0395] El bioanálisis de muestras de plasma se realizó usando un ensayo ELISA IL-2 humano calificado (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las concentraciones de Aldesleucina, E62_30kD y P65_30kD y el estándar interno en muestras derivadas de plasma se determinaron usando un ensayo ELISA. El análisis de datos PK se realizó en NW Solutions (Seattle, WA). Los datos PK se importaron a Phoenix WinNonlin v6.4 (Certara/Pharsight, Princeton, NJ) para su análisis. Los datos de la concentración plasmática media frente al tiempo del grupo se analizaron con métodos no compartimentales utilizando un modelo de administración de bolo IV.

Tabla 5: Estudio PK/PD No. E3826-U1704-Grupos De Control Y Tratamiento De Prueba En Ratones Tiernos C57/BL6

Tratamiento	Dósis*(mg/Kg)	Ruta, Programa	Punto de Tiempo	N
Control	0	IV, dósis única	13	3
Aldesleucina	0.3	IV, dósis única	13	3
P65_30kD	0.3	IV, dósis única	13	3
E62_30kD	0.3	IV, dósis única	13	3

* Dosis se refiere a la cantidad de polipéptido P65_30kD IL-2

Tabla 6: Estudio PK/PD No. E3826-U1803-Grupos De Control Y Tratamiento De Prueba-Ratones Con Tumor De Melanoma B16F-10

Tratamiento	Dósis (mg/kg)	Ruta, Programa	Punto de Tiempo	N
Ninguno (pre dosificación)	0 mg/kg	Ninguno	1	6

Vehículo de Control	0 mg/kg	IV, dósis única	9	3
P65_30kD	1 mg/kg	IV, dósis única	9	4
P65_30kD	3 mg/kg	IV, dósis única	9	4

[0396] Los perfiles de concentración plasmática de P65_30kD, E62_30kD, E62_5kD y Aldesleucina a 0.3 mg/kg se representan en la Figura 6.

[0397] En el estudio E3826-U1704, tanto P65_30kD como E62_30kD exhiben un perfil PK superior con respecto a la Aldesleucina como se resume en la Tabla 3. Después de una dosis única de Aldesleucina en bolo IV, se observó el T_{max} a las 0.03 h después de la dosis (la primera medida punto de tiempo después de la dosificación) y las concentraciones plasmáticas medias fueron medibles hasta 4 h después de la dosis. Después de una dosis única en bolo IV de P65_30kD y E62_30kD, se observó el Tmax a las 0.03 h después de la dosis y las concentraciones plasmáticas medias fueron medibles hasta 120 h después de la dosis (el último punto de tiempo medido). En un estudio separado, después de la administración intravenosa de E62_5kD, se observó el T_{max} a las 0.133 horas después de la dosis y las concentraciones plasmáticas medias se midieron hasta las 12 horas después de la dosis.

[0398] La exposición basada en C_{max} y AUC_{0-t}, fue la siguiente: Aldesleucina P65_30kD>>E62_30kD>>E62_5kD>. E62_5kD con un PEG más pequeño tenía un perfil PK más cercano a rIL-

2. La exposición a P65_30kD fue 5.5 y 200 veces mayor que la Aldesleucina basada en C_{max} y AUC_{0-t}, respectivamente. Además, P65_30kD demostró t1/2 extendido 23 veces (13.3 h vs. 0.57 h) y CL reducido aproximadamente 198 veces (6.58 vs 1300 mL/h/Kg) en comparación con la Aldesleucina. Tanto para P65_30kD como para E62_30kD, el volumen de distribución (82.4 y 92.3 mL/Kg respectivamente) se redujo en aproximadamente 4.2 a 4.7 veces con respecto a la Aldesleucina, y similar al volumen de sangre en un ratón (85 mL/Kg; [Boersen 2013]). Esto sugiere que P65_30kD y E62_30kD se distribuyen principalmente dentro de la circulación sistémica.

Tabla 7: Parámetros PK P65 30kd En Ratones Hembra C57BL/6

Parámetro	Unidades	P65_30kD	E62_30kD	E62_5kD	Aldesleucina
T_{max}	h	0.030	0.030	0.133	0.030
C_{max}	ng/mL	4,870	4,230	936	884
AUC_{0-t}	h*ng/mL	45,600	37,100	798	229
R^2		0.992	0.986	0.851	0.900
AUC_{INF}	h*ng/mL	45,600	37,100	807	230
$t_{1/2}$	h	13.300	14.500	2.56	0.573
CL	mL/h/Kg	6.580	8.07	372	1300
V_{ss}	mL/Kg	82.4	92.3	404	390

Nota: R^2 es el parámetro de bondad de ajuste para la fase terminal de cada perfil de concentración versus tiempo.
Todos los parámetros se muestran a 3 cifras significativas.

Ejemplo 4

[0399] **Observaciones Farmacodinámicas En El Compartimento De Sangre Periférica**

[0400] La fosforilación de STAT5 y la inducción de la proliferación celular (el marcador molecular temprano Ki-67 y los recuentos celulares) se usaron como lecturas farmacodinámicas para evaluar el perfil farmacológico de P65_30kD en relación con su farmacocinética. El marcador pSTAT5 PD mostró una buena correlación con PK tanto para P65_30kD como para Aldesleucina en células T efectoras CD8+ (Tabla 7). Se observó una elevación persistente de pSTAT5 en las células T NK y CD8+ hasta 72 h, y hasta 24 h en Tregs. La inducción de pSTAT5 volvió a la línea de base después de solo 2 h en ratones a los que se les administró Aldesleucina (Figura 7). La fosforilación de STAT5 se tradujo en respuestas proliferativas retardadas (72-120 horas) de células T efectoras CD8+ y células NK, pero no con reglas T (Figuras 8A-8C), el análisis fenotípico de células T efectoras CD8+ reveló una expansión sustancial de célula de memoria CD44+ dentro de esta población (Figuras 9A-9B).

[0401] **Observaciones Farmacodinámicas En El Compartimento Tumoral En Ratones B57-F10 Portadores De Tumor (E3826-U1803) C57BL/6**

[0402] La Tabla 8 muestra la concentración de fármaco en plasma y tumor después de una dosis única de P65_30kD a 3

mg/kg en ratones con tumor B16-F10. La vida media del tumor fue el doble de la vida media en plasma (24.4 frente a 12.6), lo que indica que el P65_30kD penetra en el tumor y queda retenido en el tumor. El extremo de la cola de las curvas cruzadas muestra que el plasma se elimina más rápido que el tumor. La relación tumor: AUC en plasma fue de 9.7% y 8.4% para las dosis de 1 y 3 mg/kg respectivamente.

Tabla 8: P65 30kd Parámetros PK De Plasma Y Tumor B16-F10 Con Tumor C57BL/6 Ratones Hembra

Parámetro	P65_30kD (3 mg/kg)	
	Plasma	Tumor
T_{max} (h)	*2.00	8
C_{max} (ng/mL)	40000	1550
t1/2 (h)	12.60	24.4
AUC_{0-t} (h*ng/mL)	656,000	55200
R^2	0.974	0.988
AUC_{INF} (h*ng/mL)	656,000	55200

[0403] La Figuras 10A a 10B muestran la expansión de células T NK y CD+ por P65_30kD en tumores B16F10. La Figura 10A muestra el porcentaje de células NK, células CD8+ y Tregs en la población de células T CD3+ tumorales después del tratamiento con una dosis única de bolo IV de P65_30kD a 3 g/kg. Las muestras tumorales se analizaron para las poblaciones de células inmunes 5 días después del tratamiento por citometría de flujo. Cada punto de datos representa un promedio de 3 réplicas en cada punto de tiempo, ±SEM. Los datos de población de células representados provienen de

muestras tumorales del día 5 y la relación CD8/Treg se calculó a partir de las muestras del día 7. La Figura 10B muestra la relación del efector CD8+ sobre las células T reguladoras CD4+ 7 días después del tratamiento con una dosis única de bolo IV de P65_30kD a 3 mg/kg. Cada punto de datos representa un promedio de 3 réplicas en cada punto de tiempo, ±SEM.

[0404] **Estudio De MTD En Ratones Balb/c E3826-U1802**

[0405] Se realizó un estudio de rango de dosis de P65_30kD en ratones Balb/c hembra sin tratamiento previo en Crown Biosciences, Inc. (San Diego, CA). El diseño del estudio se muestra en la Tabla 9. Se extrajeron muestras de sangre a través de la vena submandibular en 7 puntos de tiempo (0.25, 1, 4, 12, 24, 34, 48 y 72 h). Tanto las células plasmáticas como las sanguíneas fueron recolectadas para análisis PK y PD.

[0406] Todas las muestras de plasma se analizaron para IL-2 humana, así como para IL-2 de ratón, TNF-α, IFNγ, IL-5 e IL-6, empleando kits ELISA disponibles comercialmente.

Tabla 9: Estudio PK/PD Y MTD No. E3826-U1802-Grupos De Control Y Tratamiento De Prueba En Ratones Tiernos Balb/c

Tratamiento	Dósis (mg/kg)	Ruta, Programa	Punto de Tiempo	N
Naive	0 mg/kg		0	3
Vehículo de Control	0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
Aldesleucina	0.01 mg/kg	IV, BID x 3	3	3

Aldesleucina	0.03 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
Aldesleucina	0.1 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
Aldesleucina	1.0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
Aldesleucina	3.0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
Aldesleucina	5.0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
P65_30kD	0.01 mg/kg	IV, dósis única	3	3
P65_30kD	0.03 mg/kg	IV, dósis única	3	3
P65_30kD	0.1 mg/kg	IV, dósis única	3	3
P65_30kD	1.0 mg/kg	IV, dósis única	3	3
P65_30kD	3.0 mg/kg	IV, dósis única	3	3
P65_30kD	5.0 mg/kg	IV, dósis única	3	3
#P65_30kD	0.3 mg/kg	IV, dósis única	8	3

* Todos los puntos de tiempo, excepto el punto de tiempo de 72 horas, la extracción de sangre se realizó a través de la vena submandibular. El punto temporal de 72 h fue la recolección de sangre terminal.

Solo se usó la dosis de 0.3 mg/kg de P65_30kD para la evaluación de PKPD.

[0407] **Observaciones De Toxicología En El Estudio MTD Usando Ratones Balb/c**

[0408] Una de las principales toxicidades asociadas con la IL-2 en dosis altas es el síndrome de fuga vascular y el síndrome de liberación de citocinas (SRC) asociado. Para evaluar esto en ratones, se realizó una administración intravenosa de dosis única de P65_30kD a dosis que van desde la dosis de 0.01-5.0 mg/kg (Tabla 10). El análisis realizado fue hematología, histopatología, peso de los órganos y

análisis de citocinas. No se observaron anomalías con hematología, histopatología o peso corporal en relación con los ratones de control del vehículo con P65_30kD o aldesleucina. Con respecto al análisis de citocinas, se observó que la aldesleucina elevaba los niveles plasmáticos de IL-5 a partir de 1 mg/kg a 5 mg/kg (Figura 11A). Con P65_30kD, se observó un aumento moderado en IL-5 solo a dosis de 5 mg/kg y esto fue menor en comparación con la aldesleucina (Figura 11B). Se observó una elevación transitoria en los niveles sistémicos de IFNγ tanto con aldesleucina como con P65_30kD.

Ejemplo 5

[0409] **Pk/PD En Monos Cynomolgus-Estudio No.: 20157276**

[0410] El perfil farmacocinético y farmacodinámico de P65_30kD se evaluó en monos cynomolgus no tiernos tras la administración de una dosis intravenosa única a 0.3 mg/kg. El estudio se realizó en Charles River Laboratories, Inc. (Reno, NV) y el análisis de datos PK se realizó en NW Solutions (Seattle, WA). Se recogieron muestras de sangre antes de la dosis y en 21 puntos de tiempo (0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 144, 168, 192 y 240 h después de la dosis. Tanto plasma como Se recogieron células sanguíneas para análisis de PK y PD. Se utilizaron puntos de tiempo seleccionados para análisis de PK, PD, población de células y hematología.

[0411] Todas las muestras de plasma se analizaron para detectar IL-2 humana (lectura de PK) empleando kits ELISA disponibles comercialmente.

[0412] La Tabla 10 muestra los parámetros de PK P65_30kD en mono Cynomolgus.

Tabla 10

			0.3 mg/kg		
			Animal 2699	Animal 2705	Media
ROA	**Parámetro**	**Unidades**	**Estimado**		
IV	T_{max}	hr	0.500	0.500	0.500
	C_{max}	ng/mL	11000	11400	11200
	AUC_{0-t}	hr*ng/mL	121000	120000	121000
	$t_{1/2}$	hr	13.4	13.9	13.6
	CL	mL/hr/kg	2.47	2.49	2.48
	V_{ss}	mL/kg	29.0	32.1	30.5

[0413] Después de una dosis única en bolo IV, se observó Tmax a las 0.5 h después de la dosis (el primer punto de tiempo medido después de la dosificación) y las concentraciones plasmáticas medias se midieron hasta 168 h después de la dosis (la última medida) El t1/2 y el AUC para P65_30kD fueron 13.6 h y 121000 h * ng/mL respectivamente.

[0414] **Parámetros Hematológicos – Estudio De Mono Cynomolgus No.: 20157276**

[0415] Para los parámetros hematológicos, los puntos de tiempo de evaluación corresponden a la predósis en el día-1 y 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 21 postdósis.

[0416] La Figura 12 muestra los recuentos absolutos de glóbulos blancos y diferenciales. Los datos representan la media ±DE (N= 2 animales/grupo de dosis).

[0417] El análisis de las subpoblaciones de glóbulos blancos (WBC) reveló que un aumento importante en el recuento de WBC se debió a una expansión de la población de células de linfocitos que es consistente con el mecanismo de P65_30kD. No hay elevación de los eosinófilos.

Ejemplo 6

[0418] La Tabla 11 ilustra las secuencias de IL-2 descritas aquí.

Tabla 11

Nombre	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**
IL-2 (homo sapiens) (forma madura)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (homo sapiens) (precursor) Adhesión NCBI No.: AAB46883.1	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	2

[0419] Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en este 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.