

AGONISTAS DE IL2

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a variantes de interleucina-2 (IL2). En particular, la invención se refiere a un polipéptido que comprende una muteína de IL2 humana o de una variante funcional de IL2 humana, en donde la IL2 humana o variante funcional de la misma se sustituye tal que se mejora la afinidad para el complejo del receptor de $\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\beta\gamma$). En una forma de realización, la IL2 humana o variante funcional de la misma se sustituye adicionalmente tal que se reduce la afinidad para el complejo del receptor de $\alpha\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$). En una forma de realización, el polipéptido activa las células T efectoras sobre las células T reguladoras. La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la invención, células hospederas que comprenden los polinucleótidos, composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos, polinucleótidos o células hospederas, métodos terapéuticos o profilácticos de tratamiento utilizando los polipéptidos, polinucleótidos, células hospederas o composiciones farmacéuticas y preparaciones médicas que comprenden los polipéptidos, polinucleótidos, células hospederas o composiciones farmacéuticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sistema inmunitario desempeña una función importante en el cáncer, autoinmunidad, alergia así como en enfermedades asociadas a patógenos. Las células T y células exterminadoras naturales (NK) son mediadores importantes de las respuestas inmunitarias antitumorales. Las células T CD8⁺ y las células NK pueden lisar directamente las células tumorales. Las células T CD4⁺, por otra parte, pueden medir el influjo de los diferentes subconjuntos inmunitarios incluidas células T CD8⁺ y células NK en el tumor. Las células T CD4⁺ son capaces de autorizar células dendríticas (DCs) para el cebado de la respuesta de células T CD8⁺ anti-tumorales y pueden actuar directamente en las células tumorales a través de la regulación por incremento de IFN γ mediada por MHC y la inhibición de crecimiento. Las respuestas de células T específicas de tumor CD8⁺ así como CD4⁺ se pueden inducir a través de vacunación o por transferencia adoptiva de células T.

Las citoquinas desempeñan una función importante en la inmunidad. Por ejemplo, la interleucina-2 (IL2) es un estimulador inmunitario potente, que activa células diversas del sistema inmunitario, incluidas células T, células B, monocitos y células NK. La IL2 es conocida por soportar la diferenciación, proliferación, supervivencia y funciones efectoras de las células T y células NK (Blattman, J. N. y colaboradores Nat. Med. 9, 540–7 (2003)) y se ha utilizado por décadas en el tratamiento de melanoma maligno de etapa tardía (Maas, R. A., Dullens, H. F. y Den Otter, W. Cancer Immunol. Immunother. 36, 141–8 (1993)). Por consiguiente, las inmunoterapias tal como vacunas de células T o transferencia adoptiva de células T (sin tratamiento previo o transgénicas del receptor de células T o transgénicas de receptor de

antígeno quimérico) o células NK pueden beneficiarse de la administración simultánea de citoquinas similar a IL2. Una desventaja de la IL2 recombinante, sin embargo, es su semivida en plasma corta que crea la necesidad de inyectar frecuentemente altas cantidades de la citoquina. Esto conduce a graves efectos secundarios tal como síndrome de fuga vascular (VLS) (Rosenberg, S. A. y colaboradores N. Engl. J. Med. 316, 889–97 (1987)). Una segunda desventaja de la IL2 es su capacidad inherente de estimular células T reguladoras (células T_{reg}). Las células T_{reg} se correlacionan con la supervivencia reducida de los pacientes con cáncer ya que puede suprimir la función de las células T efectoras anti-tumorales y células NK (Nishikawa, H. y Sakaguchi. Curr. Opin. Immunol. 27, 1–7 (2014)). La activación de células T_{reg} puede exacerbar la supresión inmunitaria, comprometiendo potencialmente la respuesta terapéutica propuesta. Las señales de IL2 a través del receptor IL2 que existe como una versión de afinidad alta e intermedia. El receptor de IL2 de alta afinidad (IL2R $\alpha\beta\gamma$) consiste de CD25 (IL2R α), CD122 (IL2R β) y CD132 (IL2R γ) y se expresa en las células T_{reg} así como las células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas. El receptor de afinidad intermedia (IL2R $\beta\gamma$) crece de CD25 y es prevalente en las células T sin tratamiento previo y de memoria así como las células NK. Como resultado, la IL2 estimula de manera preferente células T_{reg} que expresan CD25 (Todd, J. A. y colaboradores PLoS Med. 13, e1002139 (2016)) así como células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas y son necesarias altas dosis de IL2 para activar las células T sin tratamiento previo y de memoria y las células NK. Los intentos para alterar la IL2 en tal forma que pierda preferencia para las células que expresan CD25, incrementando de esta manera relativamente el potencial estimulador de las células T sin tratamiento previo y de memoria así como las células NK mostró que mejora su potencial anti-tumoral (Arenas-Ramirez, N. y colaboradores Sci. Transl. Med. 8, 1–13 (2016)).

Existe la necesidad por estrategias novedosas para incrementar la efectividad de IL2, en particular cuando se utiliza en el contexto de inmunoterapia, en particular inmunoterapia contra el cáncer, por ejemplo, cuando se utiliza en combinación con vacunas, en particular vacunas contra el cáncer, y otras inmunoterapias tal como transferencia adoptiva de células T y NK (transgénicas del receptor sin tratamiento previo o células T o transgénicas de receptor de antígeno quimérico), y/o bloqueo de punto de control.

Se describen en la presente variantes de IL2 humana que activan de manera preferente células que expresan el receptor de IL2 de afinidad intermedia e IL2R $\beta\gamma$, en relación con las células que expresan el receptor de IL2 de alta afinidad IL2R $\alpha\beta\gamma$. En particular, se describen en al presente modificaciones apropiadas de IL2 que mejoran la unión a (y de esta manera la activación de) células que expresan IL2R $\beta\gamma$. Estas modificaciones se pueden utilizar en combinación con modificaciones que previenen la unión eficaz a (y de esta manera la activación de) células que expresan IL2R $\alpha\beta\gamma$. Una variante de IL2 capaz de activar selectivamente los recetores de IL2 de afinidad intermedia en ciertas células T tal como

células T de memoria, células T sin tratamiento previo y células T efectoras así como células NK en preferencia a los receptores de IL2 de alta afinidad en las células T reguladoras se espera que tenga un índice terapéutico mejorado sobre la IL2 de tipo natural y perfil de toxicidad reducido. Una variante de IL2 con un índice terapéutico mejorado tendría un

5 intervalo de uso significativamente expandido en el tratamiento de trastornos que requieran estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer (como una terapia directa y/o adjunta). En particular, la administración del ARN de la variante de IL2 es un procedimiento prometedor para reforzar la eficacia terapéutica de múltiples inmunoterapias basadas en células T y NK (cáncer).

10 La presente descripción proporciona variantes de IL2 novedosas. Específicamente, se describen variantes de IL2 que contienen mutaciones que mejoran la unión de IL2R $\beta\gamma$, en particular la unión de CD122 ("mut $\beta\gamma$ ") y contienen opcionalmente además mutaciones que afectan la unión de IL2R $\alpha\beta\gamma$, en particular la unión de CD25 ("mut α "). En particular, se describen en la presente variantes de IL2 que reducen la expansión de células T_{reg} e

15 incrementan la estimulación de células T y células NK efectoras, de manera preferente la estimulación de células T y células NK efectoras IL2R $\beta\gamma$ ⁺. La variante de IL2 hAlb-hIL2_A4s8 descrita en al presente muestra, comparada con la IL2 de tipo natural, una capacidad marcadamente reducida para activar las células T_{reg} e incrementar la capacidad para estimular las células inmunitarias efectoras, de manera preferente células inmunitarias efectoras

20 IL2R $\beta\gamma$ ⁺ como células T CD8⁺ y células NK ya en menores concentraciones. *In vivo*, el tratamiento con el ARNm nanoparticulado que codifica la IL2 de tipo natural o la variante de IL2 seleccionada con mutaciones que afectan tanto la unión de IL2R α como la unión de IL2R β (hAlb-hIL2_A4s8) dirigidas al hígado de ratones para disponibilidad sistémica mejoraron en gran medida crecimiento tumoral, con hIL2_A4s8 que es más eficaz. Mientras que la hAlb-hIL2

25 se incrementa principalmente en las células T específicas de antígeno y células T_{reg}, hAlb-hIL2_A4s8 activa las células NK y eleva tanto los números de células T CD8⁺ específicos de antígeno y no específicos de antígeno sin expandir las células T_{reg}. El tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 se sinergiza en gran medida con la vacunación de ARN al expandir la respuesta de células T CD8⁺ inducidas por vacuna mientras que evita la estimulación y expansión de

30 células T_{reg}, y aumenta la eficacia anti-tumoral del bloqueo de punto de control inmunitario PD-L1 al expandir específicamente las células T CD8⁺ específicas de antígeno preexistentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, se proporciona en al presente un polipéptido que comprende una muteína de interleucina-2 humana (IL2) o de una variante funcional de IL2 humana, en donde

35 la IL2 humana o la variante funcional de la misma se sustituye en al menos la posición 80 (leucina), posición 81 (arginina), posición 85 (leucina) y posición 92 (isoleucina) con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural, en

donde la sustitución mejora la afinidad para el complejo del receptor de $\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\beta\gamma$) y en donde la IL2 humana o la variante funcional de la misma no se sustituye en la posición 86 (isoleucina) con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

5 En una forma de realización, posición 80 (leucina) se sustituye por fenilalanina, posición 81 (arginina) se sustituye por ácido glutámico, posición 85 (leucina) se sustituye por valina y la posición 92 (isoleucina) se sustituye por fenilalanina con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

10 En una forma de realización, la IL2 humana o la variante funcional de la misma se sustituye además en la posición 74 (glutamina) con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural. En una forma de realización, posición 74 (glutamina) se sustituye por histidina con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

15 En un segundo aspecto, se proporciona en la presente un polipéptido que comprende una muteína de IL2 humana o de una variante funcional de IL2 humana, en donde la IL2 humana o la variante funcional de la misma se sustituye en al menos la posición 80 (leucina) por fenilalanina, posición 81 (arginina) por ácido glutámico, posición 85 (leucina) por valina y la posición 92 (isoleucina) por fenilalanina con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

20 En una forma de realización, la IL2 humana o la variante funcional de la misma se sustituye además en la posición 74 (glutamina) por histidina con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

25 En un tercer aspecto, se proporciona en la presente un polipéptido que comprende una muteína de IL2 humana o de una variante funcional de IL2 humana, en donde la IL2 humana o la variante funcional de la misma se sustituye en al menos la posición 74 (glutamina) por histidina, posición 80 (leucina) por fenilalanina, posición 81 (arginina) por ácido glutámico, posición 85 (leucina) por valina y la posición 92 (isoleucina) por fenilalanina con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

30 En una forma de realización el segundo y tercer aspectos, la sustitución mejora la afinidad para IL2R $\beta\gamma$.

35 En una forma de realización, la IL2 sustituida o variante funcional de la misma (muteína IL2) descrita en lo anterior tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la IL2 de tipo natural en los otros residuos no sustituidos. En una forma de realización, la muteína IL2 descrita en lo anterior tiene las modificaciones de aminoácidos tal como sustituciones de aminoácidos en uno o más sitios en o en los otros residuos de la IL2 humana de tipo natural. En una forma de realización, IL2R $\alpha\beta\gamma$ cuando se compara con la IL2 de tipo natural (también llamada mutaciones “muta” en la presente). En una forma de realización, estas sustituciones

de aminoácidos están en los residuos de aminoácidos que hacen contacto con IL2R α .

De esta manera, en una forma de realización, la IL2 humana o la variante funcional de la misma comprenden además una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad para la subunidad alfa del complejo del receptor de $\alpha\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$).

5 En una forma de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad para la subunidad alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ reducen la afinidad para IL2R $\alpha\beta\gamma$ a un mayor grado que para IL2R $\beta\gamma$.

En una forma de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad para la subunidad alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ comprende las sustituciones de la IL2 humana o la variante funcional de la misma en al menos una de las posiciones 35 (lisina), 43 (lisina), 61 (ácido glutámico) y 62 (ácido glutámico) con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural. En una forma de realización, si el residuo de aminoácido es un residuo de aminoácido en la IL2 humana de tipo natural las sustituciones por un residuo de aminoácido básico y si el residuo de aminoácido es un residuo de aminoácido básico en la IL2 humana de tipo natural la sustitución es por un residuo de aminoácido ácido.

En formas de realización diferentes, la una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad para la subunidad alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ comprende las sustituciones de la IL2 humana o la variante funcional de la misma en al menos las siguientes posiciones con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural:

- posición 35,
- posición 43,
- posición 61,
- 25 - posición 62,
- posición 35 y la posición 43,
- posición 35 y la posición 61,
- posición 35 y la posición 62,
- posición 43 y la posición 61,
- 30 - posición 43 y la posición 62,
- posición 61 y la posición 62,
- posición 35, posición 43 y la posición 61,
- posición 35, posición 43 y la posición 62,
- posición 35, posición 61 y la posición 62,
- 35 - posición 43, posición 61 y la posición 62, o
- posición 35, posición 43, posición 61 y la posición 62.

En una forma de realización, la posición 35 se sustituye con ácido glutámico. En una

forma de realización, la posición 43 se sustituye con ácido glutámico. En una forma de realización, la posición 61 se sustituye con lisina. En una forma de realización, la posición 62 se sustituye con lisina.

En una forma de realización, la posición 35 se sustituye. En una forma de realización, la posición 35 se sustituye con ácido glutámico.

En una forma de realización, la posición 43 se sustituye. En una forma de realización, la posición 43 se sustituye con ácido glutámico.

En una forma de realización, la posición 61 se sustituye. En una forma de realización, la posición 61 se sustituye con lisina.

En una forma de realización, la posición 62 se sustituye. En una forma de realización, la posición 62 se sustituye con lisina.

En una forma de realización, las posiciones 43 y 61 se sustituyen. En una forma de realización, la posición 43 se sustituye con ácido glutámico y la posición 61 se sustituye con lisina.

En una forma de realización, las posiciones 35, 43 y 61 se sustituyen. En una forma de realización, la posición 35 se sustituye con ácido glutámico, posición 43 se sustituye con ácido glutámico y la posición 61 se sustituye con lisina.

En una forma de realización, las posiciones 61 y 62 se sustituyen. En una forma de realización, la posición 61 se sustituye con lisina y la posición 62 se sustituye con lisina.

En una forma de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad para la subunidad alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ comprende las sustituciones de la IL2 humana o la variante funcional de la misma at posición 43 (lisina) y la posición 61 (ácido glutámico) con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural. En una forma de realización, la posición 43 (lisina) se sustituye por ácido glutámico y la posición 61 (ácido glutámico) se sustituye por lisina.

En un cuarto aspecto, se proporciona en la presente un polipéptido que comprende una muteína de IL2 humana o de una variante funcional de IL2 humana, en donde la IL2 humana o la variante funcional de la misma se sustituye en al menos la posición 43 (lisina) por ácido glutámico, posición 61 (ácido glutámico) por lisina, posición 74 (glutamina) por histidina, posición 80 (leucina) por fenilalanina, posición 81 (arginina) por ácido glutámico, posición 85 (leucina) por valina y la posición 92 (isoleucina) por fenilalanina con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

En una forma de realización del segundo al cuarto aspectos, la IL2 humana o la variante funcional de la misma no se sustituye en la posición 86 (isoleucina) con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

En una forma de realización, la IL2 humana tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

En una forma de realización, la muteína de IL2 humana o la variante funcional de la misma tiene una capacidad disminuida para estimular las células T reguladoras comparada con la IL2 humana de tipo natural.

5 En una forma de realización, la muteína de IL2 humana o la variante funcional de la misma tiene una capacidad incrementada para estimular las células T efectoras comparada con la IL2 humana de tipo natural.

La muteína de IL2 descrita en la presente se puede atraer a un grupo modificado farmacocinético y, de esta manera, puede ser una “IL2 farmacocinética (PK) extendida”.

10 En una forma de realización, el polipéptido descrito en la presente es un polipéptido farmacocinético extendido (PK). En una forma de realización, el polipéptido PK extendido comprende una proteína de fusión. En una forma de realización, la proteína de fusión comprende una porción de la muteína de IL2 humana o la variante funcional de la misma y una porción que es heteróloga a la IL2 humana o la variante funcional de la misma. En una forma de realización, la proteína de fusión comprende una porción de la muteína de IL2
15 humana o la variante funcional de la misma y una porción seleccionada de grupo que consiste de albúmina en suero, un fragmento de inmunoglobulina, transferrina, Fn3, y variantes de las mismas. En una forma de realización, la albúmina en suero comprende albúmina en suero de ratón o albúmina en suero humano. En una forma de realización, el fragmento de inmunoglobulina comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.

20 En un aspecto, se proporciona en la presente un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 2, 11, 13, y 22, tal como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 22 del listado de secuencias.

25 Los polipéptidos descritos en lo anterior también son llamados “polipéptido variante de IL2” o simplemente “variante de IL2” en la presente.

En un aspecto, se proporciona en la presente un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito en la presente. En una forma de realización, el polinucleótido es ARN.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera que comprende el polinucleótido descrito en la presente.

30 En un aspecto, se proporciona en la presente el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, o la célula hospedera descrita en la presente para uso farmacéutico. En una forma de realización, el uso farmacéutico comprende un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno.

35 En un aspecto, se proporciona en la presente el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, o la célula hospedera descrita en la presente para el uso en un método para tratar o prevenir cáncer en un sujeto.

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que

comprende el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, o la célula hospedera descrita en la presente.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar un sujeto que comprende administrar al sujeto el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, la célula hospedera descrita en la presente, o la composición farmacéutica descrita en la presente.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, la célula hospedera descrita en la presente, o la composición farmacéutica descrita en la presente.

En una forma de realización, el sujeto se trata además utilizando una o más inmunoterapias, por ejemplo, utilizando vacunación o transferencia adoptiva de células T, tal como vacunas de células T o transferencia adoptiva de células T o células NK (transgénicas sin tratamiento previo o receptor de células T o transgénicas de receptor antígeno quimérico).

La efectividad de las vacunas, en donde el antígeno ya sea se suministra *per se* o como un polinucleótido, en particular como ARN que codifica el antígeno (por ejemplo ARN que codifica un péptido o proteína utilizado para vacunación también es referido como “péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno”, “antígeno de vacuna” o simplemente “antígeno descrito en la presente) se puede incrementar al co-administrar los polipéptidos variantes de IL2 descritos en al presente, en donde el polipéptido variante de IL2 es ya sea se suministra *per se* o como un polinucleótido, en particular ARN que codifica el polipéptido variante de IL2. La vacuna es particularmente eficaz y el ARN que codifica el polipéptido variante de IL2 se dirige al hígado para disponibilidad sistémica. Las células del hígado se pueden transfectar eficientemente y son capaces de producir grandes propiedades de proteína. El ARN de codificación a antígeno se dirige de manera preferente a órganos linfoides secundarios. Además, la vacuna es particularmente eficaz y un inhibidor de punto de control inmunitario tal como un anticuerpo anti-PD-L1 se administra adicionalmente.

En una forma de realización, el método descrito en la presente comprende además administrar al sujeto un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno en el sujeto o un polinucleótido que codifica el péptido o proteína. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica péptido o proteína es ARN.

En una forma de realización, el método descrito en la presente es un método para tratar o prevenir cáncer en un sujeto, en donde opcionalmente el antígeno es un antígeno asociado a tumor.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar o prevenir cáncer

en un sujeto que comprende administrar al sujeto el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, la célula hospedera descrita en la presente, o la composición farmacéutica descrita en la presente.

5 En una forma de realización, el método comprende además administrar al sujeto a péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno asociado a tumor en el sujeto o un polinucleótido que codifica el péptido o proteína. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el péptido o proteína es ARN.

10 En una forma de realización, los métodos descritos en la presente comprenden administrar a un sujeto:

- a. ARN que codifica el polipéptido variante de IL2 descrito en la presente; y
- b. ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno en el sujeto.

15 En una forma de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de melanoma, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de colon, mesotelioma, carcinoma de células renales y cáncer cerebral.

20 En una forma de realización, los métodos descritos en la presente comprenden además administrar al sujeto un inhibidor de punto de control inmunitario. En una forma de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario dirige la interacción entre (i) PD-1 y PD-L1, o (ii) CTLA-4 y CD80 o CD86. En una forma de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se dirige a PD-1, PD-L1, o CTLA-4.

25 En una forma de realización, el ARN que codifica el polipéptido variante de IL2 descrito en la presente, el ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno en el sujeto, y opcionalmente el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente.

En un aspecto, se proporciona en la presente una preparación médica que comprende el polipéptido descrito en la presente, el polinucleótido descrito en la presente, la célula hospedera descrita en la presente, o la composición farmacéutica descrita en la presente.

30 En una forma de realización, la preparación médica comprende además péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno en un sujeto o un polinucleótido que codifica el péptido o proteína. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el péptido o proteína es ARN.

35 En una forma de realización, la preparación médica comprende el polipéptido, polinucleótido, célula hospedera, o composición farmacéutica y el péptido o proteína que comprende un epítipo o polinucleótido que codifica el péptido o proteína, respectivamente, en recipientes separados.

En una forma de realización, la preparación médica comprende:

- a. ARN que codifica el polipéptido variante de IL2 descrito en la presente; y
- b. ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno en un sujeto.

5 En una forma de realización de la preparación médica, el ARN está presente en una forma seleccionada de una forma líquida, una forma sólida, o una combinación de las mismas. En una forma de realización, la forma sólida es una forma congelada o una forma deshidratada. En una forma de realización, la forma deshidratada es una forma secada por congelación o secada por pulverización.

10 En una forma de realización, la preparación médica comprende además un inhibidor de punto de control inmunitario. En una forma de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario dirige la interacción entre (i) PD-1 y PD-L1, o (ii) CTLA-4 y CD80 o CD86. En una forma de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se dirige
15 a PD-1, PD-L1, o CTLA-4.

En una forma de realización, la preparación médica es un kit. En una forma de realización, la preparación médica comprende cada componente a. y b. en un recipiente separado.

En una forma de realización, la preparación médica es una composición farmacéutica.
20 En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende además un o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una forma de realización, la preparación médica comprende instrucciones para el uso de la preparación médica para tratar o prevenir cáncer en donde opcionalmente el antígeno es un antígeno asociado a tumor.

25 En un aspecto, se proporciona en la presente la preparación médica descrita en la presente para uso farmacéutico. En una forma de realización, el uso farmacéutico comprende un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno.

En un aspecto, se proporciona en la presente la preparación médica descrita en la presente para el uso en un método para tratar o prevenir cáncer en un sujeto, en donde
30 opcionalmente el antígeno es un antígeno asociado a tumor.

En una forma de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de melanoma, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de colon, mesotelioma, carcinoma de células renales y cáncer cerebral.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al polipéptido variante de IL2 descrito
35 en la presente, el polinucleótido que codifica el polipéptido variante de IL2 descrito en la presente, la célula hospedera que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido variante de IL2 descrito en la presente, o la composición farmacéutica descrita en la presente

para el uso en un método descrito en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURAS 1A-1C: Actividad funcional de las variantes de hAlb-hIL2_A4 en diferentes subconjuntos de linfocitos en PBMCs humanas medidas por fosforilación mediada por IL2 de STAT5.

Curvas de dosis-respuesta de fosforilación STAT5 (pSTAT5) de células CD4⁺CD25⁺ T_{reg} (**FIGURA 1A**), células T citotóxicas CD8⁺ (**FIGURA 1B**) así como células NK CD56⁺ (**FIGURA 1C**). Se incubaron PBMCs humanas con diluciones en serie del sobrenadante que contiene la variante de hAlb-hIL2_A4 y la fosforilación STAT5 se analizó subsecuentemente en diferentes subconjuntos de linfocitos a través de citometría de flujo. Los sobrenadantes de las células HEK293T/17 lipofectadas con ARNm que codifican para hAlb solo se utilizaron como control negativo. Los datos mostrados son valores individuales de un experimento representativo ajustado con un ajuste logarítmico de cuatro parámetros para calcular los valores EC₅₀.

FIGURAS 2A-2C: Actividad funcional de las variantes de hAlb-hIL2_A4 en diferentes subconjuntos de linfocitos en esplenocitos de ratón medidos o fosforilación mediada por IL2 de STAT5.

Curvas de dosis-respuesta de la fosforilación STAT5 (pSTAT5) de células CD4⁺CD25⁺ T_{reg} (**FIGURA 2A**), células T citotóxicas CD8⁺ (**FIGURA 2B**) así como células NK (**FIGURA 2C**). Se incubaron esplenocitos Balb/c con diluciones en serie del sobrenadante que contiene la variante de hAlb-hIL2_A4 y la fosforilación de STAT5 se analizó subsecuentemente en diferentes subconjuntos de linfocitos a través de citometría de flujo. Los sobrenadantes de las células HEK293T/17 lipofectadas con ARNm que codifica para hAlb solamente se utilizaron como control negativo. Los datos mostrados son valores individuales de un experimento representativo ajustado con un ajuste logarítmico de cuatro parámetros para calcular los valores EC₅₀.

FIGURAS 3A-3B: Bioactividad relativa de las variantes de hAlb-hIL2_A4 en el cultivo celular dependiente de receptor de IL2 de afinidad intermedia (IL2Rβγ) y de receptor de IL2 de afinidad alta (IL2Rαβγ).

Se muestran respuestas de proliferación de la línea de células humanas que expresan el receptor de IL2 de afinidad intermedia (IL2Rβγ) TF-1_hIL2Rβγ (**FIGURA 3A**) y la línea de células humanas que expresan el receptor de IL2 de alta afinidad (IL2Rαβγ) TF-1_hIL2Rαβγ (**FIGURA 3B**). Se incubaron cultivos celulares durante tres días con diluciones en serie de los sobrenadantes que contienen la variante de hAlb-hIL2_A4 y se midió la proliferación al cuantificar las células viables a través de la cantidad de ATP utilizando el ensayo CellTiter-Glo^{MR} 2.0. Los datos mostrados son media±SD de n=2 replicados técnicos ajustados con un ajuste logarítmico de cuatro parámetros para calcular los valores EC₅₀. RLU = unidades de

luminiscencia relativa.

FIGURAS 4A-4B: Unión de IL2R α humana (CD25) e IL2R β humana (CD122) por hAlb-hIL2_A4s8 en comparación con hAlb-hIL2_A4 y hAlb-hIL2.

100 ng de CD25-Fc humana recombinante unida a placa (**FIGURA 4A**) o CD122-Fc humana (**FIGURA 4B**) se incubó con sobrenadantes que contienen la variante de hAlb-hIL2 diluida 1:2 y se detectó la proteína unida a través de un anticuerpo de Albúmina en suero antihumano conjugado con HRP. Los sobrenadantes de las células HEK293T/17 lipofectadas con ARNm que codifica para hAlb solo se utilizaron como control negativo. Los datos mostrados son media $\pm$ SD de n=2 replicados técnicos.

FIGURAS 5A-5C: Comparación de hAlb-hIL2_A4s8 con hAlb-hIL2 con respecto a la actividad funcional en diferentes subconjuntos de células inmunitarias en PBMCs humanas medidas por fosforilación mediada por IL2 de STAT5.

Curvas de dosis-respuesta de fosforilación de STAT5 (pSTAT5) de células CD4⁺CD25⁺T_{reg} (**FIGURA 5A**), células T citotóxicas CD8⁺ (**FIGURA 5B**) y células NK CD56⁺ (**FIGURA 5C**). Se incubaron las PBMCs humanas con diluciones en serie del sobrenadante que contiene la variante de hAlb-hIL2 y la fosforilación de STAT5 se analizó subsecuentemente en diferentes subconjuntos de linfocitos a través de citometría de flujo. Los datos mostrados son media $\pm$ SD de n=2 replicados técnicos ajustados con un ajuste logarítmico de cuatro parámetros para calcular los valores EC₅₀.

FIGURAS 6A-6B: Actividad funcional de hAlb-hIL2_A4s8 en comparación con hAlb-hIL2 en diferentes subconjuntos de células T en PBMCs de ratón medidas por fosforilación mediada por IL2 de STAT5.

Curvas de dosis-respuesta de fosforilación de STAT5 (pSTAT5) de células CD4⁺CD25⁺T_{reg} (**FIGURA 6A**), y células T citotóxicas CD8⁺ (**FIGURA 6B**). Las PBMCs aisladas de sangre entera de ratones Balb/c se incubaron con diluciones en serie de sobrenadantes que contienen la variante de hAlb-hIL2 y la fosforilación de STAT5 se analizó subsecuentemente en diferentes subconjuntos de células T a través de citometría de flujo. Los datos mostrados son valores individuales de un experimento representativo ajustado con un ajuste logarítmico de cuatro parámetros para calcular los valores EC₅₀.

FIGURAS 7A-7B: Crecimiento tumoral reducido que da por resultado supervivencia mejorada tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 comparada con hAlb-hIL2 en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

Ratones BALB/c (n=11 por grupo) se inocularon con 5 $\times$ 10⁵ células tumorales CT26 subcutáneamente (s.c.) y se vacunaron intravenosamente (i.v.) cuatro veces a la semana (día 10, 17, 24, y 31) con 20 μ g de ARN-LPX que codifica el antígeno de células T CD8⁺ gp70. Las ARNs que codifican para hAlb-hIL2_A4s8 o hAlb-hIL2 (3 μ g cada una) y se formulan como

LNPs se administraron i.v. concomitantemente con la vacuna de ARN. El grupo de control recibió la vacuna de ARN con hAlb (no codifica para ninguna citoquina) formulado como LNPs. (FIGURA 7A) Crecimiento tumoral de ratones individuales y (FIGURA 7B) supervivencia de ratones tratados con hAlb-hIL2 o hAlb-hIL2_A4s8 en combinación con la vacuna gp70. Las líneas punteadas indican días de tratamiento. Las relaciones en (FIGURA 7A) representan el número de ratones sin tumor sobre el número total de ratones por grupo.

FIGURAS 8A-8B: Expansión de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral y células NK tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 comparada con hAlb-hIL2 en combinación con una vacuna de ARN terapéutico en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

(FIGURA 8A) Números absolutos de células T específicas de gp70 y (FIGURA 8B) células NK por μ L de sangre determinados siete días después de los primeros tres tratamientos (día 17, 24 y 31) a través de citometría de flujo de los ratones BALB/c descritos en el Ejemplo 6 y FIGURA 7. Las líneas punteadas indican días de tratamiento, los números en las líneas punteadas indican el número de tratamientos. Media $\pm$ SEM. Se determinó la significancia estadística utilizando el ANOVA de dos vías seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

FIGURAS 9A-9B: Expansión de las células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral sobre las células T_{reg} tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 comparada con hAlb-hIL2 en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo carcinoma de colon murino CT26.

(FIGURA 9A) Números absolutos de células T CD8⁺ específicas no de antígeno, células T CD4⁺ y células T_{reg} por μ L de sangre determinados siete días después del primer tratamiento (día 17) a través de citometría de flujo de ratones BALB/c descrito en el Ejemplo 6, FIGURAS 7A-7B y FIGURAS 8A-8B. (FIGURA 9B) Relación de células T CD8⁺ específicas de antígeno (izquierda) o células T CD8⁺ específicas no de antígeno (derecha) sobre las células T_{reg}. Los puntos representan ratones individuales, las líneas representan la media del grupo. Se determinó la significancia estadística utilizando el ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

FIGURAS 10A-10B: Crecimiento tumoral reducido que da por resultado supervivencia mejorada después del tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 sola en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

Ratones BALB/c (n=11 por grupo) se inocularon con 5×10^5 células tumorales CT26 subcutáneamente (s.c.) y se trataron intravenosamente (i.v.) cuatro veces a la semana (día 10, 17, 24 y 31) con ARN que codifica para hAlb-hIL2_A4s8 y se formula como LNP, con o sin una

vacunación i.v. concomitante con 20 µg de gp70 ARN-LPX. El grupo de control recibió una vacuna de ARN que no codifica para ningún antígeno (vacuna irr) con hAlb (no codifica para ninguna citoquina) formulada como LNPs, o vacuna de gp70 sola. **(FIGURA 10A)** Crecimiento tumoral de ratones individuales y **(FIGURA 10B)** supervivencia de los ratones tratados con hAlb-hIL2_A4s8 con o sin la vacuna de gp70. Las líneas punteadas indican días de tratamiento. Las relaciones en **(FIGURA 10A)** representan el número de ratones sin tumor sobre el número total de ratones por grupo.

FIGURAS 11A-11C: Expansión de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral y células NK mientras que no afecten las células T_{reg} tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

(FIGURA 11A) Números absolutos de células T específicas de gp70, **(FIGURA 11B)** células NK, y **(FIGURA 11C)** células T_{reg} por µL de sangre determinados siete días después de los primeros tres tratamientos (día 17, 24 y 31) a través de citometría de flujo de ratones BALB/c descritos en el Ejemplo 7 y FIGURAS 10A-10B. Las líneas punteadas indican días de tratamiento, los números en las líneas punteadas indican número de tratamientos. Media±SEM. Se determinó la significancia estadística utilizando el ANOVA de dos vías seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

FIGURAS 12A-12C. Expansión de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral sobre células T_{reg} tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

(FIGURA 12A) Números absolutos de células T CD8⁺ específicas de antígeno, células T CD8⁺ totales y células T CD4⁺ por µL de sangre determinados siete días después del primer tratamiento (día 17) a través de citometría de flujo de ratones BALB/c descritos en el Ejemplo 6, FIGURAS 10A-10B y FIGURAS 11A-11C. **(FIGURA 12B)** Relación de células T CD8⁺ específicas de antígeno (izquierda) o células T CD8⁺ totales (derecha) sobre células T_{reg}. **(FIGURA 12C)** Cambio de veces de los subconjuntos de células T CD8⁺ en los grupos tratados sobre las medias correspondientes de los subconjuntos de células T CD8⁺ en el grupo de control. Los puntos representan ratones individuales, las líneas representan el grupo medio. Media±SEM. Se determinó la significación estadística utilizando el ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

FIGURAS 13A-13B: Crecimiento tumoral reducido que da por resultado supervivencia mejorada después del tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 comparado con hAlb-hIL2 en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo de

melanoma murino B16.

Ratones C57BL/6 (n=15 por grupo) se inocularon subcutáneamente (s.c.) con 3×10^5 células de melanoma B16-F10 y se trataron intravenosamente (i.v.) cinco veces a la semana (día 8, 15, 22, 29 y 36) con ARN que codifica para hAlb-hIL2 o hAlb-hIL2_A4s8 y se formularon como LNP, con o sin vacunación i.v. concomitante con 20 µg de TRP1 ARN-LPX. El grupo de control recibió una vacuna de ARN que no codifica para cualquier antígeno (vacuna irr) con hAlb (que no codifica para ninguna citoquina) formulada como LNPs, o hAlb con la vacuna TRP1. **(FIGURA 13A)** Crecimiento tumoral de los ratones individuales y **(FIGURA 13B)** supervivencia de los ratones tratados con hAlb-hIL2 o hAlb-hIL2_A4s8 con o sin vacuna de TRP1. Las líneas punteadas indican días de tratamiento. Las relaciones en **(FIGURA 13A)** representan el número de ratones sin tumor sobre el número total de ratones por grupo.

FIGURAS 14A-14C: Expansión de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral y células NK mientras que no afecten las células T_{reg} tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 comparado con hAlb-hIL2 en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo de melanoma murino B16.

(FIGURA 14A) Números absolutos de células T específicos de TRP1, **(FIGURA 14B)** células NK y **(FIGURA 14C)** células T_{reg} por µL de sangre determinados siete días después de los primeros tres tratamientos (día 15, 25 y 29) a través de citometría de flujo de ratones C57BL/6 descritos en el Ejemplo 8 y FIGURAS 13A-13B. Las líneas punteadas indican días de tratamiento, los números en las líneas punteadas indican número de tratamientos. Media±SEM. Se determinó la significancia estadística utilizando el ANOVA de dos vías seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

FIGURAS 15A-15C: Expansión de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral sobre células T_{reg} tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 y hAlb-hIL2 en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo de melanoma murino B16.

(FIGURA 15A) Números absolutos de células T CD8⁺ específicas de antígeno, células T CD8⁺ totales y células T CD4⁺ por µL de sangre determinados siete días después del primer tratamiento (día 15) a través de citometría de flujo de ratones C57BL/6 descritos en el Ejemplo 8, FIGURAS 13A-13B y FIGURAS 14A-14C. **(FIGURA 15B)** Relación de células T CD8⁺ totales (izquierda superior) y células T CD8⁺ específicas de antígeno (derecha superior, izquierda inferior) sobre células T_{reg}. **(FIGURA 15C)** Cambio de veces de subconjuntos de células T CD8⁺ en los grupos tratados sobre las medias correspondientes de los subconjuntos de células T CD8⁺ en el grupo de control. Los puntos representan ratones individuales, las líneas representan la media del grupo. Media±SEM. Se determinó la significancia estadística

utilizando el ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

FIGURAS 16A-16B: Crecimiento tumoral reducido que da por resultado supervivencia mejorada después del tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 en combinación con el bloqueo de PD-L1 en el modelo de carcinoma de colon murino MC38.

Ratones C57BL/6 (n=14 por grupo) se inocularon subcutáneamente (s.c.) con 7.5×10^5 células de carcinoma de colon MC38 y se trataron i.v. cuatro veces a la semana (día 17, 24, 32 y 39) con ARN que codifica para hAlb-hIL2_A4s8 y se formularon como LNP, con o sin tratamiento intraperitoneal concomitante (i.p.) con el anticuerpo anti-PD-L1 (primera inyección de 200 μg , luego 100 μg para todas las inyecciones consecutivas). Los grupos de control recibieron hAlb (que no codifica para ninguna citoquina) formulado como LNPs y el anticuerpo de control de isotipo, o hAlb y anti-PD-L1. Los subconjuntos de linfocitos de sangre y las respuestas de células T específicas de Adpgk se determinaron siete días después del segundo tratamiento (día 31) a través de citometría de flujo. **(FIGURA 16A)** Crecimiento tumoral de ratones individuales y **(FIGURA 16B)** supervivencia de los ratones tratados con hAlb-hIL2_A4s8 con o sin el anticuerpo anti-PD-L1. Las líneas punteadas indican días de tratamiento. Las relaciones en **(FIGURA 16A)** representan el número de ratones sin tumor durante el número total de ratones por grupo.

FIGURAS 17A-17B: Expansión de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral sobre células T_{reg} tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 en combinación con el bloqueo de PD-L1 en el modelo de carcinoma de colon murino MC38.

(FIGURA 17A) Números absolutos de células T CD8⁺ totales, células T CD8⁺ específicas de antígeno, células T CD4⁺ totales y células T_{reg} por μL de sangre determinados siete días después del segundo tratamiento (día 31) a través de citometría de flujo de ratones C57BL/6 descritos en el ejemplo 9, FIGURAS 16A-16B. **(FIGURA 17B)** Relación de células T CD8⁺ totales (izquierda) y células T CD8⁺ específicas de antígeno (derecha) sobre las células T_{reg}. Los puntos representan ratones individuales, las líneas representan la media del grupo. Se determinó la significancia estadística utilizando el ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

FIGURAS 18A-18M: Modulación de números de linfocitos en el tumor y la sangre tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 en combinación con el bloqueo de punto de control PD-L1 en el modelo de tumor murino MC38.

Ratones C57BL/6 (n=7-8 por grupo) se inocularon subcutáneamente (s.c.) con 7.5×10^5 células de carcinoma de colon MC38 y 19 días después se trataron i.v. con ARN formulado con LNP que codifica para hAlb-hIL2_A4s8 y tratamiento i.p. concomitante con el anticuerpo

anti-PD-L1. Los grupos de control recibieron una de las dos terapias o no recibieron tratamiento en absoluto (control para hAlb-hIL2_A4s8: ARN de hAlb formulado como LNP('hAlb'); control para el anticuerpo anti-PD-L1: Anticuerpo de isotipo ('iso')). El tumor y la sangre de los ratones se muestrearon en el día 24 y se analizaron por citometría de flujo.

- 5 (FIGURA 18A-18H) Análisis de subconjuntos de linfocitos infiltrantes de tumor. Números (FIGURA 18A) células T CD8⁺, (FIGURA 18B) células NK y (FIGURA 18C) células T CD4⁺. (FIGURA 18D) Fracción de células T_{reg} CD25⁺FoxP3⁺ entre células T CD4⁺. (FIGURA 18E) Relación de células T CD8⁺ a células T_{reg}. Números de células T CD8⁺ específicas de neoantígeno (FIGURA 18F) Adpgk, (FIGURA 18G) Rpl18 y (FIGURA 18H) N4bp2l2. (FIGURA
- 10 18I-18M) Análisis de subconjuntos de linfocitos en la sangre. Números de células T (FIGURA 18I) CD8⁺ y (FIGURA 18J) CD4⁺ así como células T CD8⁺ específicas de neoantígeno (FIGURA 18K) Adpgk, (FIGURA 18L) Rpl18 y (FIGURA 18M) N4bp2l2. Se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando una prueba de Kruskal-Wallis (gráficas con una escala log10) o una prueba de ANOVA de una vía (gráficas con una escala lineal) seguido por prueba de
- 15 comparación múltiple de Dunn o Dunnett, respectivamente. Todos los análisis fueron de dos colas y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8. ns P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- Aunque la presente descripción se describe con detalle a continuación, se va a entender que esta descripción no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente ya que éstos pueden variar. También se va a entender que la terminología utilizada en la presente es para el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no se proponen limitar el alcance de la presente descripción que será limitada solo con las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otra manera, todos los
- 20 términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados como es comúnmente entendido por uno de experiencia ordinaria en la técnica.

- De manera preferente, los términos utilizados en la presente se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea,
- 30 Suiza, (1995).

- La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique de otra manera, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología, y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (ver, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook y colaboradores eds., Cold
- 35 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

En lo siguiente, se describirán los elementos de la presente descripción. Estos elementos se listan con formas de realización específicas, sin embargo, se debe entender que

se pueden combinar de cualquier forma y en cualquier número para crear formas de realización adicionales. Los ejemplos y formas de realización diversamente descritos no se deben considerar que limitan la presente descripción a solo las formas de realización explícitamente descritas. Esta descripción se debe entender que describe y abarca formas de realización que combinan las formas de realización explícitamente descritas con cualquier número de los elementos descritos. Además, cualquier permutación y combinaciones de todos los elementos descritos se deben considerar descritos por esta descripción a menos que el contexto lo indique de otra manera.

El término “alrededor” significa aproximadamente o casi, y en el contexto de un valor o intervalo numérico expuesto en la presente en una forma de realización significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, o $\pm 3\%$ del valor o intervalo numérico citado o reivindicado.

Los términos “un” y “uno/una” y “el/la” y referencias similares utilizada en el contexto para describir la descripción (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se va a considerar que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o se contradiga claramente por el contexto. La cita de intervalos de valores en la presente es simplemente propuesta para servir como un método de abreviatura para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique de otra manera en la presente, cada valor individual se incorpora en la especificación como si se hubiera citado individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente o se contradiga claramente de otra manera por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”), proporcionada en la presente se propone simplemente para ilustrar mejor la descripción y no posee una limitación en el alcance de las reivindicaciones. Ningún lenguaje en la especificación se debe considerar que indica cualquier elemento no reivindicado esencial a la práctica de la descripción.

A menos que se especifique expresamente de otra manera, el término “que comprende” se utiliza en el contexto del presente documento para indicar que miembros adicionales pueden estar presentes opcionalmente además de los miembros de la lista introducida por “que comprende”. Sin embargo, se contempla como una forma de realización específica de la presente descripción que el término “que comprende” abarque la posibilidad de que no estén presentes miembros adicionales, es decir, para el propósito de esta forma de realización “que comprende” se va a entender por tener el significado de “que consiste de”.

Se citan varios documentos por todo el texto de esta especificación. Cada uno de los documentos citados en la presente (incluidas todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etcétera) ya sea supra o infra, se incorporan por este medio por referencia en su totalidad. Nada en la presente se va

a considerar como una admisión de que la presente descripción no tiene derecho a antedatar esta descripción.

En lo siguiente, se proporcionarán definiciones que aplican a todos los aspectos de la presente descripción. Los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique de otra manera. Cualquiera de los términos indefinidos tiene su significado reconocidos en la técnica.

Definiciones

“Reducir”, “disminuir” o “inhibir” como se utiliza en la presente significa una disminución total en la capacidad de provocar una disminución total, de manera preferente de 5% o mayor, 10% o mayor, 20% o mayor, de manera más preferente de 50% o mayor, y de manera mucho más preferente de 75% o mayor, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de unión.

Los términos tal como “incrementar” o “mejorar” se refiere de manera preferente a un incremento o mejora por alrededor de al menos 10%, de manera preferente al menos 20%, de manera preferente al menos 30%, de manera más preferente al menos 40%, de manera más preferente al menos 50%, aún de manera más preferente al menos 80%, y de manera mucho más preferente al menos 100%, al menos 200%, al menos 500%, o aún más.

De acuerdo con la descripción, el término “péptido” comprende oligo y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden alrededor de dos o más, alrededor de 3 o más, alrededor de 4 o más, alrededor de 6 o más, alrededor de 8 o más, alrededor de 10 o más, alrededor de 13 o más, alrededor de 16 o más, alrededor de 20 o más, y hasta alrededor de 50, alrededor de 100 o alrededor de 150, aminoácidos consecutivos ligados entre sí a través de uniones de péptido. El término “proteína” o “polipéptido” se refiere a péptidos grandes, en particular péptidos que tienen al menos alrededor de 50 aminoácidos, pero los términos “péptido”, “proteína” y “polipéptido” se utilizan en la presente usualmente como sinónimos.

Una “proteína terapéutica” tiene un efecto positivo o ventajoso en una afección o estado de enfermedad de un sujeto cuando se proporciona al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una forma de realización, una proteína terapéutica tiene propiedades curativas o paliativas y se puede administrar para mejorar, aliviar, mejorar, revertir, retrasar el inicio de o reducir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Una proteína terapéutica puede tener propiedades profilácticas y se puede utilizar para retrasar el inicio de una enfermedad o para reducir la gravedad de esta enfermedad o afección patológica. El término “proteína terapéutica” incluye proteínas o péptidos completos, y también puede referirse a fragmentos terapéuticamente activos de los mismos. También puede incluir variantes terapéuticamente activas de una proteína. Ejemplos de proteínas terapéuticamente activas incluyen, pero no se limitan a, citoquinas y antígenos para vacunación.

“Fragmento”, con referencia a una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína), se

refiere a una parte de una secuencia de aminoácidos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de aminoácidos acortada en la N-terminal y/o C-terminal. Un fragmento acortado en la C-terminal (fragmento N-terminal) se obtiene por ejemplo, por traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 3' del marco de lectura abierto. Un fragmento acortado en la N-terminal (fragmento C-terminal) se obtiene por ejemplo, por traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 5' del marco de lectura abierto, siempre y cuando el marco de lectura abierto truncado comprenda un codón de inicio que sirve para iniciar la traducción. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende por ejemplo, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% de los residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende de manera preferente al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, o al menos 100 aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos.

Por "variante" o "proteína variante" o "polipéptido variante" se propone en la presente una proteína que difiere de una proteína de tipo natural en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido precursor puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo natural (WT), o puede ser una versión modificada de un polipéptido de tipo natural. De manera preferente, el polipéptido variante de tiene al menos una modificación de aminoácido comparada con el polipéptido precursor, por ejemplo, de 1 a alrededor de 20 modificaciones de aminoácidos, y de manera preferente de 1 a alrededor de 10 o de 1 a alrededor de 5 modificaciones de aminoácidos comparadas con el precursor.

Por "polipéptido precursor", "proteína precursora", "polipéptido precursor" o "proteína precursora", como se utiliza en la presente, se propone un polipéptido no modificado que se modifica subsecuentemente para generar una variante. Un polipéptido precursor puede ser un polipéptido de tipo natural, o una variante de o versión modificada de un polipéptido de tipo natural.

Por "tipo natural" o "WT" o "nativo" se propone en la presente una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas variaciones alélicas. Una proteína o polipéptido de tipo natural tiene una secuencia de aminoácidos que no se ha modificado intencionalmente.

Para los propósitos de la presente descripción, "variantes" de una secuencia de aminoácidos (péptido, proteína o polipéptido) comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. El término "variante" incluye todas las variantes de empalme, variantes postraduccionalmente modificadas, conformaciones, isoformas y homólogos de especie, en particular aquellos se expresan naturalmente por las células. El término "variante" incluye, en particular, fragmentos de una secuencia de aminoácidos.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque la inserción aleatoria con la clasificación apropiada del producto resultante también es posible. Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxi-terminal de uno o más aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína también son llamadas variantes de truncamiento N-terminales y/o C-terminales. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por al menos un residuo en la secuencia que se elimina y otro residuo que se inserta en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que están en las posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas o péptidos homólogos y/o para reemplazar los aminoácidos con otros que tengan propiedades similares. De manera preferente, los cambios de aminoácidos en las variantes de péptido y proteína son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos similarmente cargados o no cargados. Un cambio de aminoácido conservador implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que se relacionan con sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen en general en cuatro familias: aminoácidos acídicos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, triptófano y tirosina algunas veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En una forma de realización, las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos:

glicina, alanina;
 valina, isoleucina, leucina;
 ácido aspártico, ácido glutámico;
 asparagina, glutamina;
 serina, treonina;
 lisina, arginina; y
 fenilalanina, tirosina.

De manera preferente, el grado de similitud, de manera preferente identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de la secuencia de aminoácidos dada será al menos alrededor de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o identidad se da de manera preferente para una región de aminoácido que es al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos
 5 alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90% o alrededor de 100% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da de manera preferente para al menos alrededor de 20, al menos alrededor de 40, al menos alrededor de 60, al menos alrededor de
 10 80, al menos alrededor de 100, al menos alrededor de 120, al menos alrededor de 140, al menos alrededor de 160, al menos alrededor de 180 o alrededor de 200 aminoácidos, de manera preferente aminoácidos continuos. En formas de realización preferidas, el grado de similitud o identidad se da para la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, de manera preferente la
 15 identidad de secuencia, se puede hacer con herramientas conocidas en la técnica, de manera preferente utilizando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, utilizando Align, utilizando ajustes estándares, de manera preferente EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Abertura de Espacio 10.0, Extensión de Espacio 0.5.

“Similitud de secuencia” indica el porcentaje de aminoácidos que ya sea son idénticos
 20 o que representan sustituciones de aminoácidos conservadoras. “Identidad de secuencia” entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término “porcentaje de identidad” se propone para indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenidos
 25 después de la mejor alineación, este porcentaje es simplemente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias que se distribuyen aleatoriamente y sobre su longitud completa. Las comparaciones de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente al comparar estas secuencias después de haberlas alineado óptimamente, la comparación se lleva a cabo por segmento o por “ventana de comparación” a
 30 fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptimo de las secuencias para comparación se puede producir, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas informáticos que utilizan estos algoritmos
 35 (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula al determinar el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicar el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

5 Las secuencias de aminoácidos homólogas muestran de acuerdo con la descripción al menos 40%, en particular al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y de manera preferente al menos 95%, al menos 98 o al menos 99% identidad de los residuos de aminoácidos.

10 Las variantes de secuencia de aminoácidos descritas en la presente se pueden preparar fácilmente por la persona experta, por ejemplo, por manipulación de ADN recombinante. La manipulación de las secuencias de ADN para preparar péptidos o proteínas que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones, se describe con detalle por Sambrook y colaboradores (1989), por ejemplo. Además, los péptidos y variantes de aminoácidos descritos en la presente se pueden preparar fácilmente con la ayuda de técnicas
15 de síntesis de péptidos conocidas, tal como, por ejemplo, por síntesis de fase sólida y métodos similares.

En una forma de realización, un fragmento o variante de una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína) es de manera preferente un “fragmento funcional” o “variante funcional”. El término “fragmento funcional” o “variante funcional” de una secuencia de aminoácidos se refiere a cualquier fragmento o variante de que muestre una o más
20 propiedades funcionales idénticas o similares a aquellas de la secuencia de aminoácidos de la cual se deriva, es decir, es funcionalmente equivalente. Con respecto a las citoquinas tal como IL2, una función particular es una o más actividades inmunomoduladoras mostradas por la secuencia de aminoácidos de la cual el fragmento o variante de y/o la unión al receptor o
25 receptores de la secuencia de aminoácidos de la cual se deriva el fragmento o la variante. La variante derivada se une. El término “fragmento funcional” o “variante funcional”, como se utiliza en la presente, en particular se refiere a una molécula variante de o secuencia que comprende una secuencia de aminoácidos que se altera por uno o más aminoácidos comparada con la secuencia de aminoácidos de la molécula precursora o secuencia y que es
30 capaz de cumplir una o más de las funciones de la molécula o secuencia precursora, por ejemplo, se une a una molécula objetivo o contribuye a la unión a una molécula objetivo. En una forma de realización, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la molécula o secuencia precursora no afectan significativamente o alteran la afinidad de unión de la molécula o secuencia. En diferentes formas de realización, la unión del fragmento funcional o
35 variante funcional se puede reducir pero aun significativamente están presentes, por ejemplo, la unión de la variante funcional puede ser al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de la molécula o secuencia precursora. Sin embargo, en otras

formas de realización, la unión del fragmento funcional o variante funcional se puede mejorar comparada con la molécula o secuencia precursora.

Una secuencia de aminoácidos (péptido, proteína o polipéptido) “derivada” de una secuencia de aminoácidos designada (péptido, proteína o polipéptido) se refiere al origen de la primera secuencia de aminoácidos. De manera preferente, la secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de aminoácidos particular tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica, esencialmente idéntica u homóloga a aquella secuencia particular o un fragmento de la misma. Las secuencias de aminoácidos derivadas de una secuencia de aminoácidos particular pueden ser variantes de esa secuencia particular o un fragmento de la misma. Por ejemplo, se entenderá por uno de experiencia ordinaria en la técnica que los antígenos y citoquinas (por ejemplo, IL2) adecuada para el uso en la presente se puede alterar tal que puede variar en secuencia de las secuencias de origen natural o nativas de las cuales se derivaron, mientras que retienen la actividad deseable de las secuencias nativas.

Como se utiliza en la presente, un “material de instrucciones” o “instrucciones” incluyen una publicación, una grabación, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se puede utilizar para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de instrucciones del kit de la invención, por ejemplo, se puede fijar a un recipiente que contiene las composiciones de la invención o se envía junto con un recipiente que contiene las composiciones. Alternativamente, el material de instrucciones se puede enviar separadamente del recipiente con la intención de que el material de instrucciones y las composiciones se utilicen cooperativamente por el recipiente.

“Aislado” significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está “aislado”, pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”. Un ácido nucleico o proteína aislada puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospeda.

El término “recombinante” en el contexto de la presente invención significa “hecho a través de modificación genética”. De manera preferente, un “objeto recombinante”, tal como una célula recombinante en el contexto de la presente invención, no es de origen natural.

El término “origen natural”, como se utiliza en la presente, se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos virus) y se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio, es de origen natural.

El término “modificación genética” o simplemente “modificación” incluye la transfección

de células con ácido nucleico. El término “transfección” se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para propósitos de la presente invención, el término “transfección” también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula o la captación de un ácido nucleico por esta célula, en donde la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. De esta manera, de acuerdo con la presente invención, una célula para transfección de un ácido nucleico descrita en la presente puede estar presente *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. De acuerdo con la invención, la transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas aplicaciones de transfección, es suficiente si el material genético transfectado se expresa solo transitoriamente. El ARN se puede transfectar en las células para expresar transitoriamente su proteína codificada. Puesto que el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección no se integra usualmente en el genoma nuclear, el ácido nucleico anterior se diluirá a través de mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episómica de ácidos nucleicos reducen en gran medida la velocidad de dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado permanezca actualmente en el genoma de la célula y sus células hijas, se puede presentar una transfección estable. Esta transfección estable se puede lograr al utilizar sistemas basados en virus o sistemas basados en transposones para la transfección. En general, las células que se modifican genéticamente para expresar un polipéptido receptor, por ejemplo, IL2R o variante de IL2R, y/o un receptor de antígeno, por ejemplo, TCR o CAR, se transfectan establemente con ácido nucleico que codifica el polipéptido receptor y/o ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno, mientras que, en general, el ácido nucleico que codifica un polipéptido ligando tal como una variante de IL2 y/o ácido nucleico que codifica el antígeno se transfecta transitoriamente en las células.

El término “polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se utiliza en la presente, se propone incluir ADN y ARN tal como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas recombinantemente producidas y químicamente sintetizadas. Un ácido nucleico puede ser de hebra individual o doble hebra. El ARN incluye ARN transcrito *in vitro* (IVT ARN) o ARN sintético. De acuerdo con la invención, se aísla de manera preferente un polinucleótido.

Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector. El término “vector”, como se utiliza en la presente, incluye cualquiera de los vectores conocidos por la persona experta, incluidos vectores plásmidos, vectores cósmidos, vectores de fago tal como fago lambda, vectores virales tal como vectores retrovirales, adenovirales o baculovirales, o vectores de cromosoma artificiales tal como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Los vectores incluyen la expresión así como vectores de clonación. Los vectores de expresión que comprenden plásmidos así como vectores virales y en general contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la

secuencia de codificación operablemente ligada en un organismo hospedero particular (por ejemplo, bacterias, levadura, planta, insecto, o mamífero) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se utilizan en general para modificar y amplificar un cierto fragmento de ADN deseado y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, el ácido nucleico tal como un ácido nucleico que codifica una variante de IL2, ácido nucleico que codifica una IL2R o variante de IL2R, ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno o ácido nucleico que codifica un antígeno de vacuna se expresa en las células, en particular células de un sujeto tratado para proporcionar la variante de IL2, IL2R o variante de IL2R, el receptor de antígeno o antígeno de vacuna. En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, el ácido nucleico se expresa transitoriamente en las células del sujeto. De esta manera, en una forma de realización, el ácido nucleico no se integra en el genoma de las células. En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, el ácido nucleico es ARN, de manera preferente ARN transcrito *in vitro*.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente pueden ser moléculas recombinantes y/o aisladas.

En la presente descripción, el término “ARN” se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye residuos de ribonucleótidos. En formas de realización preferidas, el ARN contiene todo o una mayoría de residuos de ribonucleótidos. Como se utiliza en la presente, “ribonucleótido” se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El ARN abarca, sin limitación, ARN de doble hebra, ARN de hebra individual, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN recombinantemente producido, así como ARN modificado que difiere del ARN de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Estas alteraciones pueden ser referidas además del material no de nucleótido a nucleótidos de ARN internos o al extremo(s) de ARN. También se contempla en la presente que los nucleótidos en el ARN pueden ser nucleótidos no estándares, tal como nucleótidos o desoxinucleótidos químicamente sintetizados. Para la presente descripción, estos ARN alterados se consideran análogos de ARN de origen natural.

En ciertas formas de realización de la presente descripción, el ARN es un ARN mensajero (ARNm) que se refiere a un transcripto de ARN que codifica una proteína péptido. Como se establece en la técnica, el ARNm contiene en general una región no traducida 5' (5'-UTR), una región de codificación de péptido y una región no traducida 3' (3'-UTR). En algunas formas de realización, el ARN se produce por transcripción *in vitro* o síntesis química. En una forma de realización, el ARNm se produce por transcripción *in vitro* utilizando una plantilla de ADN donde el ADN se refiere a un ácido nucleico que contiene desoxiribonucleótidos.

En una forma de realización, el ARN es ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) y se puede obtener por transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor para cualquier ARN polimerasa. Una plantilla de ADN para la transcripción *in vitro* se puede obtener por clonación de un ácido nucleico, en particular ADNc, y al introducirlo en un vector apropiado para transcripción *in vitro*. El ADNc se puede obtener por transcripción inversa de ARN.

En una forma de realización, el ARN puede tener ribonucleótidos modificados. Ejemplos de ribonucleótidos modificados incluyen, sin limitación, 5-metilcitosina, pseudouridina y/o 1-metil-pseudouridina.

En algunas formas de realización, el ARN de acuerdo con la presente descripción comprende una tapa 5'. En una forma de realización, el ARN de la presente descripción no tiene 5'-trifosfatos no terminados. En una forma de realización, el ARN se puede modificar por un análogo de tapa 5'. El término "tapa 5'" se refiere a una estructura encontrada en el extremo 5' de una molécula de ARNm y consiste en general de un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de una ligación de trifosfato 5' a 5'. En una forma de realización, esta guanosina se metila en la posición 7. La proporción un ARN con una tapa 5' o análogo de tapa 5' se puede lograr por transcripción *in vitro*, en la cual la tapa 5' se expresa co-transcripcionalmente en la hebra de ARN, o se puede unir al ARN post-transcripcionalmente utilizando enzimas de terminación.

En algunas formas de realización, el ARN de acuerdo con la presente descripción comprende una 5'-UTR y/o una 3'-UTR. El término "región no traducida" o "UTR" se refiere a una región en una molécula de ADN que se transcribe pero no se traduce en una secuencia de aminoácidos, o a la región correspondiente en una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm. Una región no traducida (UTR) puede estar presente 5' (cadena arriba) de un marco de lectura abierto (5'-UTR) y/o 3' (cadena abajo) de un marco de lectura abierto (3'-UTR). Una 5'-UTR, si está presente, se sitúa en el extremo 5', cadena arriba del codón de inicio de una región que codificación de proteína. Una 5'-UTR está cadena abajo de la tapa 5' (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la tapa 5'. Una 3'-UTR, si está presente, se sitúa en el extremo 3', cadena abajo del codón de terminación de una región que codifica de proteína, pero el término "3'-UTR" no incluye de manera preferente la cola poli(A). De esta manera, la 3'-UTR está cadena arriba de la secuencia poli(A) (si está presente), por ejemplo directamente adyacente a la secuencia poli(A).

En algunas formas de realización, el ARN de acuerdo con la presente descripción comprende una secuencia 3'-poli(A). Como se utiliza en la presente, el término de "secuencia poli(A)" o "cola poli-A" se refiere a una secuencia no interrumpida o interrumpida de residuos de adenilato que se sitúa típicamente en el extremo 3' de una molécula de ARN. Las secuencias de poli(A) son conocidas por aquellos expertos en la técnica y pueden seguir la

UTR 3' en los ARNs descritos en la presente. La secuencia poli(A) puede ser de cualquier longitud. En algunas formas de realización, una secuencia poli(A) comprende o consiste de al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 80, o al menos 100 y hasta 500, hasta 400, hasta 300, hasta 200, o hasta 150 nucleótidos y, en particular, alrededor de 100 nucleótidos.

5 En algunas formas de realización, la secuencia de poli(A) solo consiste de nucleótidos A. En algunas formas de realización, la secuencia de poli(A) consiste esencialmente de nucleótidos A, pero se interrumpe por una secuencia aleatoria de los cuatro nucleótidos (A, C, G y U), como se describe en WO 2016/005324 A1, incorporado en la presente por referencia. Esta secuencia aleatoria puede tener de 5 a 50, de 10 a 30 o de 10 a 20 nucleótidos de
10 longitud. Un casete de poli(A) presente en la hebra de codificación de ADN que consiste esencialmente de nucleótidos dA, pero se interrumpe por una secuencia aleatoria que tiene una distribución igual de los cuatro nucleótidos (dA, dC, dG, dT) y que tiene una longitud de por ejemplo de 5 a 50 nucleótidos muestra, en un nivel de ADN, propagación constante del ADN plasmídico en *E. coli* y se asocia a, un nivel de ARN, con las propiedades benéficas con
15 respecto a la estabilidad de ARN de soporte y eficiencia traduccional.

En algunas formas de realización, ninguno de los nucleótidos diferentes a los nucleótidos A flanquea una secuencia de poli(A) en su extremo 3', es decir, la secuencia de poli(A) no se enmascara ni seguida en su extremo 3' por un nucleótido diferente a A.

En el contexto de la presente descripción, el término "transcripción" se refiere a un
20 proceso, en donde el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Subsecuentemente, el ARN se puede traducir en el péptido o proteína.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de las secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en los procesos biológicos que
25 tienen ya sea una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. De esta manera, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm que corresponde a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra de codificación, la secuencia de nucleótidos de la cual es idéntica a la secuencia de
30 ARNm y se proporciona usualmente en los listados de secuencias, como la hebra no de codificación, utilizada como la plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden ser referida como que codifica el proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Como se utiliza en la presente, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

35 Como se utiliza en la presente, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" como se utiliza en la presente se define como la transcripción

y/o la traducción de una secuencia de nucleótidos particular.

Como se utiliza en la presente, los términos “ligado”, “fusionado” o “fusión” se utilizan intercambiamente. Estos términos se refieren a la unión conjunta de dos o más elementos o componentes o dominios.

5 Las citoquinas son una categoría de proteínas pequeñas (~5-20 kDa) que son importantes en la señalización celular. Su liberación tiene un efecto en el comportamiento de las células alrededor de ellas. Las citoquinas se implican en la señalización autocrina, señalización paracrina y señalización endocrina como agentes inmunomoduladores. Las citoquinas incluyen quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas, y factores de necrosis
10 tumoral, pero en general no hormonas o factores de crecimiento (a pesar de un solapamiento en la terminología). Las citoquinas se producen por una amplia gama de células, incluidas células inmunitarias como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, y mastocitos, así como células endoteliales, fibroblastos y varias células estromales. Se puede producir una citoquina dada por más de un tipo de célula. Las citoquinas actúan a través de receptores, y son
15 especialmente importantes en el sistema inmunitario; las citoquinas modulan el balance entre las respuestas inmunitarias humores y basadas en células, y regulan la maduración, crecimiento, y capacidad de respuesta de las poblaciones celulares particulares. Algunas citoquinas mejoran o inhiben la acción de otras citoquinas en formas complejas.

La interleucina-2 (IL2) es una citoquina que induce la proliferación de células T
20 activadas con antígeno y estimula las células exterminadoras naturales (NK). La actividad biológica de IL2 es mediada a través de un complejo de receptor de IL2 multi-subunidades (IL2R) de tres subunidades de polipéptido que abarcan la membrana celular: p55 (IL2R α , la subunidad alfa, también conocida como CD25 en humanos), p75 (IL2R β , la subunidad beta, también conocida como CD122 en humanos) y p64 (IL2R γ , la subunidad gamma, también
25 conocida como CD132 en humanos). La respuesta de células T a IL2 depende una variedad de factores, incluido: (1) la concentración de IL2; (2) el número de moléculas de IL2R en la superficie celular; y (3) el número de IL2R ocupada por IL2 (es decir, la afinidad de la interacción de unión entre IL2 e IL2R (Smith, “Cell Growth Signal Transduction is Quantal” en Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors 766:263-271,
30 1995)). El complejo de IL2:IL2R se internaliza tras la unión del ligando y los diferentes compuestos se someten a clasificación diferencial. Cuando se administra como un bolo intravenoso (i.v.), la IL2 tiene una rápida eliminación sistémica (una fase de eliminación inicial con una semivida de 12.9 minutos seguido por una fase de eliminación más lenta con una semivida de 85 minutos) (Konrad y colaboradores, Cancer Res. 50:2009-2017, 1990).

35 En las células eucariotas a IL2 humana se sintetiza como un polipéptido precursor de 153 aminoácidos, de los cuales 20 aminoácidos se eliminan para generar IL2 secretadas maduras. La IL2 humana recombinante se ha producido en *E. coli*, en células de insecto y en

células de COS de mamífero.

Los resultados de la administración de IL2 sistémica en los pacientes con cáncer están lejos de ser ideales. Mientras que 15 a 20 por ciento de pacientes responden objetivamente a la IL2 de dosis alta, la gran mayoría no lo hace, y pueden padecer efectos secundarios graves, mortales, incluida náusea, confusión, hipotensión y choque séptico. La toxicidad grave asociada con el tratamiento de IL2 de dosis alta es en gran medida atribuible a la actividad de las células exterminadoras naturales (NK). Se ha intentado reducir la concentración en suero al reducir la dosis y al ajustar el régimen de dosificación, y aunque son menos tóxicos, estos tratamientos también son menos eficaces.

De acuerdo con la descripción, ciertas formas de realización, los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente comprenden un grupo modificador farmacocinético. En una forma de realización, la porción variante de IL2 o muteína descrita en la presente se une a un grupo modificador farmacocinético. La molécula resultante, a partir de ahora referida como una "IL2 farmacocinética extendida (PK)", tiene semivida en circulación prolongada con respecto a la IL2 libre. La semivida en circulación prolongada de la PK IL2 extendida permite las concentraciones de IL2 en suero *in vivo* que se mantengan dentro de un intervalo terapéutico, conduciendo potencialmente a la activación mejorada de muchos tipos de células inmunitarias, incluidas células T. Debido a su perfil farmacocinético favorable, la PK IL2 extendida se puede dosificar menos frecuentemente y por periodos de tiempo más prolongados cuando se compara con la IL2 no modificada.

Como se utiliza en la presente, "semivida" se refiere al tiempo tomado para la concentración en suero o plasma de un compuesto tal como un péptido o proteína para reducir por 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación y/o eliminación o secuestro por mecanismos naturales. Una interleucina (IL) PK extendida adecuada para el uso en la presente se estabiliza *in vivo* y su semivida aumenta mediante, por ejemplo, la fusión con albúmina en suero (por ejemplo, HSA o MSA), que resiste la degradación y/o eliminación o secuestro. La semivida se puede determinar de cualquier forma conocida *per se*, tal como por análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán claras para la persona experta en el campo, y por ejemplo puede implicar en general los pasos de administrar adecuadamente una dosis adecuada de la secuencia de aminoácidos o compuesto a un sujeto; recolectar la muestras de sangre u otras muestras del sujeto en intervalos regulares; determinar el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto en la muestra de sangre; y calcular, de (una gráfica de) los datos obtenidos de esta manera, el tiempo hasta el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto que se ha reducido por 50% comparado con el nivel de inicio tras la dosificación. Se proporcionan detalles adicionales en, por ejemplo, libros de texto estándares, tal como Kenneth, A. y colaboradores, *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* y en Peters y colaboradores,

Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a Gibaldi, M. y colaboradores, Pharmacokinetics, 2ª Edición Rev., Marcel Dekker (1982).

Como se utiliza en la presente, "IL2 humana" o "la IL2 humana de tipo natural" significa IL2, ya sea nativa o recombinante, tiene la secuencia de 133 aminoácidos de origen natural de la IL2 humana nativa (menos del péptido señal, que consiste de 20 aminoácidos N-terminal adicionales), cuya secuencia de aminoácidos se describe por Fujita, y colaboradores, PNAS USA, 80, 7437-7441 (1983), con o sin una Metionina N-terminal adicional que se incluye necesariamente cuando la proteína se expresa como una fracción intracelular en *E. coli*. En una forma de realización, la IL2 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, una variante funcional de IL2 humana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, una variante funcional de IL2 humana se une al receptor de IL2.

En ciertas formas de realización descritas en la presente, la porción variante de IL2 u muteína se fusiona a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL2 y de manera preferente no es una variante de IL2). El policétido heterólogo puede incrementar la semivida circulante de IL2. Como se plantea con detalle adicional infra, el polipéptido que incrementa la semivida circulante puede ser albúmina en suero, tal como albúmina en suero humano o de ratón.

Como se utiliza en la presente, "muteína de IL2" significa una variante de IL2 (incluidas variantes funcionales de la misma), en particular un polipéptido en donde se han hecho sustituciones específicas a la proteína IL2.

En una forma de realización, se han hecho sustituciones a la proteína IL2 humana que mejoran la unión de IL2R $\beta\gamma$ ("mut $\beta\gamma$ "), en particular la unión de CD122. Por ejemplo, las muteínas de IL2 se pueden caracterizar por gustaciones de aminoácidos de la cadena de polipéptido de IL2 nativa tales sustituciones de aminoácidos, que resultan, por ejemplo, en la afinidad relativamente incrementada para IL2R $\beta\gamma$ cuando se compara con la IL2 de tipo natural, tal que la estimulación mediadas por IL2 ya no requiere acoplamiento del IL2R α . Estos mutantes son potentes agonistas de señalización de IL2. Las formas de realización particularmente preferidas incluyen lo siguiente: residuo de leucina (Leu) en la posición 80, residuo de arginina (Arg) en la posición 81, residuo de leucina (Leu) en la posición 85 y residuo de isoleucina (Ile) en la posición 92, con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural.

En una forma de realización, se han hecho sustituciones adicionales a la proteína de IL2 humana que afectan la unión de IL2R $\alpha\beta\gamma$, en particular la unión de CD25 ("mut α "). Por ejemplo, las muteínas de IL2 también se pueden caracterizar por sustituciones de aminoácidos

de la cadena de polipéptido de IL2 nativo tal que las sustituciones de aminoácidos que resultan, por ejemplo, en afinidad relativamente disminuida para IL2R $\alpha\beta\gamma$, en particular la subunidad α de la misma, cuando se compara con la IL2 de tipo natural (es decir, las muteínas IL2 además de las mutaciones “mut $\beta\gamma$ ” también comprenden mutaciones “mut α ”). Estas mutaciones pueden estar en los residuos de aminoácidos que hacen contacto con IL2R α . Las formas de realización partidamente preferidas incluyen lo siguiente: residuo de lisina (Lys) en la posición 35, residuo de lisina (Lys) en la posición 43, residuo de ácido glutámico (Glu) en la posición 61 y residuo de ácido glutámico (Glu) en la posición 62, con respecto a la IL2 humana de tipo natural y se enumera de acuerdo con la IL2 humana de tipo natural, o cualquier combinación de las mismas.

Las muteínas de IL2 pueden tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la IL2 de tipo natural en los otros residuos no sustituidos (es decir, las muteínas IL2 comprenden “mut $\beta\gamma$ ” y opcionalmente mutaciones “mut α ”, por ejemplo, aquellas mutaciones en las cuales la secuencia de SEQ ID NO: 2 u 11 difiere de la secuencia de SEQ ID NO: 1). Sin embargo, las muteínas IL2 también se pueden caracterizar por inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios en o en los otros residuos de la cadena de polipéptido de IL2 nativa. De acuerdo con esta invención cualquiera de estas inserciones, deleciones, sustituciones y modificaciones pueden dar por resultado una muteína de IL2 que tiene afinidad mejorada para IL2R $\beta\gamma$ mientras que tienen opcionalmente afinidad reducida para IL2R $\alpha\beta\gamma$.

El residuo(s) de aminoácidos sustituido puede ser, pero no necesariamente, sustituciones conservadora.

Por “numerado de acuerdo con la IL2 de tipo natural” los inventores proponen identificar un aminoácido elegido con referencia a la posición en la cual el aminoácido se presenta naturalmente en la secuencia madura de la IL2 de tipo natural. Donde las inserciones o deleciones se hacen a la muteína de IL2, uno de experiencia en la técnica apreciará que un aminoácido que se presenta normalmente en una cierta posición se puede cambiar en la posición en la muteína. Sin embargo, la ubicación del aminoácido cambiado se puede determinar fácilmente por inspección y correlación de los aminoácidos de flaqueo con aquellos que flanquean el aminoácido en IL2 de tipo natural.

Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente y polinucleótidos que codifican los mismos se pueden producir por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Estos métodos incluyen introducir cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico que codifica IL2 o por síntesis in vitro de polinucleótido o proteína de IL2. Por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica el polipéptido variante de IL2 descrito en la presente se puede construir y aquellas secuencias se pueden expresar en un hospedero adecuadamente transformado o en cualquier otro sistema de expresión adecuado. Este

método producirá los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente y/o ARN que codifican los mismos. Sin embargo, los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente y polinucleótidos que codifican los mismos también se pueden producir, aunque menos de manera preferente, por síntesis química.

5 Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente se pueden unir a IL2R $\beta\gamma$ con una afinidad que es mayor que la afinidad con la cual la IL2 de tipo natural se une a IL2R $\beta\gamma$. En una forma de realización, Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente pueden unirse a IL2R $\alpha\beta\gamma$ con una afinidad que es más baja que la afinidad con la cual IL2 de tipo natural se une a IL2R $\alpha\beta\gamma$.

10 La afinidad de Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente a IL2R $\beta\gamma$ puede ser al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor que la afinidad con la cual la IL2 de tipo natural se une a IL2R $\beta\gamma$. Además, la afinidad de los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente a IL2R $\alpha\beta\gamma$ puede ser al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al
15 menos 20 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces menor que la afinidad con la cual la IL2 de tipo natural se une a IL2R $\alpha\beta\gamma$.

Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente pueden tener una capacidad disminuida para estimular las células T reguladoras que IL2 de tipo natural, en particular cuando se compara con la capacidad para estimular las células T efectoras y/o células NK.

20 Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente pueden tener una mutación (por ejemplo, una delección, adición, o sustitución) de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más residuos de aminoácidos con respecto a la IL2 de tipo natural.

Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente pueden incluir una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 65%, al
25 menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 87%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, o al menos alrededor de 99% idéntica a IL2 de tipo natural.

En una forma de realización, los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente
30 tienen una o más, de manera preferente todas las siguientes propiedades:

1) Acción agonista en IL2R $\beta\gamma$. Esta propiedad se puede evaluar directamente en ensayos de proliferación *in vitro* con líneas de células dependientes de IL2.

2) Pérdida de capacidad, comparada con la IL2 de tipo natural, para estimular las poblaciones *in vitro* y/o *in vivo* de células T reguladoras. Esta propiedad se puede evaluar, por
35 ejemplo, al estudiar la capacidad de las muteínas, comparadas con aquellas de IL2 de tipo natural, para inducir la expansión de las células T reguladoras.

3) Efecto terapéutico incrementado con respecto a la IL2 nativa en los modelos

animales. Esto se puede evaluar, por ejemplo, al comparar el efecto antitumor o anti-metastásico de los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente y la IL2 de tipo natural como monoterapia en modelos de tumor trasplantables (por ejemplo melanoma B16). También se puede evaluar a través del efecto potenciador de la respuesta celular y/o humoral a una vacuna de interés.

Muchas células inmunitarias regulan por incremento transitoriamente IL2R $\alpha\beta\gamma$ tras la activación para incrementar la sensibilidad de IL2 cuando se monta una respuesta inmunológica, incluido el cebador de las células CD8. Puesto que puede ser necesaria alguna unión de IL2R $\alpha\beta\gamma$ por IL2, la presente invención prevé el uso de una mezcla de polipéptidos variantes de IL2 selectivos de IL2R $\beta\gamma$ descritos en la presente en combinación con IL2 (incluidas variantes funcionales de las mismas) que no muestran afinidad preferencial hacia IL2R $\beta\gamma$, tal como IL2 de tipo natural. En ciertas formas de realización, la relación molar de los polipéptidos variantes de IL2 selectivos de IL2R $\beta\gamma$ descritos en la presente a IL2 que no muestran afinidad preferencial hacia IL2R $\beta\gamma$ es de 50:1 a 1:1, 20:1 a 2:1, 10:1 a 5:1, o 5:1 a 3:1.

Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente se pueden preparar como polipéptidos de fusión o quiméricos que incluyen una porción variante de IL2 y polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL2 o una variante de la misma). Las variantes de IL2 se pueden fusionar a un grupo PK extendido, que incrementa la semivida en circulación. Ejemplos no limitantes de grupos PK extendido se describen infra. Se debe entender que los otros grupos PK que incrementan la semivida en circulación de las citoquinas o variantes de los mismos, también son aplicables a la presente descripción. En ciertas formas de realización, el grupo PK extendido es un dominio de albúmina en suero (por ejemplo, albúmina en suero de ratón, albúmina en suero humano).

Como se utiliza en la presente, el término "PK" es un acrónimo para "farmacocinético" y abarca propiedades de un compuesto que incluye, por medio de ejemplo, absorción, distribución, metabolismo, y eliminación por un sujeto. Como se utiliza en la presente, un "grupo PK extendido" se refiere a una proteína, péptido, o porción que incrementa la semivida en circulación de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona a o se administra conjuntamente con la molécula biológicamente activa. Ejemplos de un grupo PK extendido incluyen albúmina en suero (por ejemplo, HSA), Inmunoglobulina Fc o fragmentos Fc y variantes de los mismos, transferrina y variantes de los mismos, y aglutinantes de albúmina en suero humano (HSA) (como se describe en la Publicación Estadounidense Nos. 2005/0287153 y 2007/0003549). Otros grupos PK extendidos ejemplares se describen en Kontermann, Expert Opin Biol Ther, 2016 Jul;16(7):903-15 que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Como se utiliza en la presente, una "IL PK extendida" se refiere a una porción de una interleucina (IL) (incluida una porción variante de IL de) en combinación

con un grupo PK extendido. En una forma de realización, la IL PK extendida es una proteína de fusión en la cual una porción de IL se liga o se fusiona a un grupo PK extendido. Una proteína de fusión ejemplar es una fusión de HSA/IL2 en la cual una porción de IL2 se fusiona con HSA.

5 En ciertas formas de realización, la semivida en suero de una IL PK extendida se incrementa con respecto a la IL sola (es decir, la IL no se fusiona aun grupo PK extendido). En ciertas formas de realización, la semivida en suero de la IL PK extendida es al menos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, o 1000% más larga a la semivida en suero de la IL sola. En ciertas formas de realización, la semivida en suero de la IL PK extendida es al
10 menos 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, o 50 veces mayor que la semivida en suero de la IL sola. En ciertas formas de realización, la semivida en suero de la IL PK extendida es al menos 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas,
15 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas, o 200 horas.

 En ciertas formas de realización, el grupo PK extendido incluye albúmina en suero, o fragmentos de la misma o variantes de la albúmina en suero o fragmentos de la misma (todas de las cuales para el propósito de la presente descripción están comprendidas por el término
20 “albúmina”). Los polipéptidos descritos en la presente se pueden fusionar a la albúmina (o un fragmento o variante de l) para formar proteínas de fusión de albúmina. Estas proteínas de fusión de albúmina se describen en la Publicación Estadounidense No. 20070048282.

 Como se utiliza en la presente, “proteína de fusión de albúmina” se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o
25 variante de la misma) a al menos una molécula de una proteína tal como una proteína terapéutica, en particular IL2 (o variante de la misma). La proteína de fusión de albúmina se puede generar por traducción de un ácido nucleico en el cual un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica se une dentro del marco con un polinucleótido que codifica una albúmina. La proteína terapéutica y la albúmina como una vez siendo parte de la proteína de
30 fusión de albúmina, cada una puede referirse como una “porción”, “región” o “porción” de la proteína de fusión de albúmina (por ejemplo, una “porción de proteína terapéutica” o una “porción de proteína de albúmina”). En una forma de realización altamente preferida, una proteína de fusión de albúmina comprende al menos una molécula de una proteína terapéutica (incluido, pero no limitado a una forma madura de la proteína terapéutica) y al
35 menos una molécula de la albúmina (incluida pero no limitada a una forma madura de la albúmina). En una forma de realización, una proteína de fusión de albúmina se procesa por una célula hospedera tal como una célula del órgano objetivo para el ARN administrado, por

ejemplo una célula de hígado, y se secreta en la circulación. En el procesamiento de la proteína de fusión de albúmina naciente que se presenta en las rutas secretoras de la célula hospedera utilizada para la expresión de ARN puede incluir, pero no se limitan a, escisión de péptido señal; formación de uniones de disulfuro; plegamiento apropiado; adición y procesamiento de carbohidratos (tal como por ejemplo, glicosilación N- y O-ligada); escisiones proteolíticas específicas; y/o ensamble en las proteínas multiméricas. Una proteína de fusión de albúmina se codifica de manera preferente por ARN en una forma no procesada que en particular tiene un péptido señal y su N-terminal y después de la secreción por una célula está de manera preferente presente en la forma procesada en donde en particular el péptido señal se ha escindido. En una forma de realización mucho más preferida, la “forma procesada de una proteína de fusión de albúmina” se refiere a un producto de proteína de fusión de albúmina que se ha sometido a escisión de péptido señal N-terminal, también referido en la presente como una “proteína de fusión de albúmina madura”.

En formas de realización preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden una proteína terapéutica tienen una estabilidad en plasma más alta comparada con la estabilidad en plasma de la misma proteína terapéutica cuando no se fusiona a la albúmina. La estabilidad en plasma se refiere habitualmente al periodo de tiempo entre cuando la proteína terapéutica se administra *in vivo* y se lleva en el torrente sanguíneo y cuando la proteína terapéutica se degrada y se elimina del torrente sanguíneo y cuando la proteína terapéutica se degrada y se elimina del torrente sanguíneo, en un órgano, tal como el riñón o hígado que elimina finalmente la proteína terapéutica del cuerpo. Se calcula la estabilidad de un plasma en términos de la semivida de la proteína terapéutica en el torrente sanguíneo. La semivida de la proteína terapéutica en el torrente sanguíneo se puede determinar fácilmente por ensayos comunes conocidos en la técnica.

Como se utiliza en la presente, “albúmina” se refiere colectivamente a la proteína de albúmina o secuencia de aminoácidos, o un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. En particular, “albúmina” se refiere a una albúmina humana o fragmentos o variantes de la misma especialmente la forma madura de la albúmina humana o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de los mismos, o variantes de estas moléculas. La albúmina se puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, humano, ratón, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas no de mamífero incluyen, pero no se limitan a, gallina y salmón. La porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina puede ser de un animal diferente que la porción de proteína terapéutica.

En ciertas formas de realización, la albúmina se albúmina en suero (HSA), o fragmentos o variantes de los mismos, tal como aquellos descritos en US 5,876,969, WO 2011/124718, WO 2013/075066, y WO 2011/0514789.

Los términos, albúmina en suero humano (HSA) y albúmina humana (HA) se utilizan intercambiabilmente en la presente. Los términos, “albúmina” y “albúmina en suero” son más amplios, y abarcan albúmina en suero humano (y fragmentos y variantes de los mismos) así como albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de los mismos).

5 Como se utiliza en la presente, un fragmento de albúmina suficiente para prolongar la actividad terapéutica o estabilidad en plasma de la proteína terapéutica se refiere a un fragmento de albúmina suficiente en longitud o estructura para estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o estabilidad en plasma de la proteína para que la estabilidad en plasma de la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina se prolongue o se
10 extienda comparada con la estabilidad en plasma en el estado no de fusión.

La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la longitud completa de la secuencia de albúmina o, pueden incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o estabilidad en plasma. Estos fragmentos pueden ser de 10 o más aminoácidos en longitud, o pueden incluir
15 alrededor de 15, 20, 25, 30, 50, o más aminoácidos contiguos de la secuencia de albúmina o pueden incluir parte o todo los dominios específicos de la albúmina. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o más fragmentos de HSA que abarcan los primeros dos dominios similares a inmunoglobulina. En una forma de realización preferida, el fragmento de HSA es la forma madura de HSA.

20 Hablando generalmente, un fragmento o variante de albúmina será al menos 100 aminoácidos de largo, de manera preferente al menos 150 aminoácidos de largo.

De acuerdo con la descripción, la albúmina puede ser albúmina de origen natural o un fragmento o variante de la misma. La albúmina puede ser albúmina humana y se puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero. En una forma de
25 realización, la albúmina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 23.

De manera preferente, la proteína de fusión de albúmina comprende albúmina como la
30 porción N-terminal, y una proteína terapéutica como la porción C-terminal. Alternativamente, una proteína de fusión de albúmina que comprende albúmina como la porción C-terminal, y una proteína terapéutica como la porción N-terminal también se puede utilizar. En otras formas de realización, la proteína de fusión de albúmina tiene una proteína terapéutica fusionada tanto a la C-terminal como la C-terminal de la albúmina. En una forma de realización, las
35 proteínas terapéuticas fusionadas en la N y C-terminales son las mismas proteínas terapéuticas. En otra forma de realización preferida, las proteínas terapéuticas fusionadas en la N- y C-terminales son diferentes proteínas terapéuticas. En una forma de realización, la

proteínas diferentes pueden ser útiles para tratar o prevenir las mismas o una enfermedad relacionada, trastorno o afección.

En una forma de realización, la proteína(s) terapéutica se une a la albúmina a través de (a) un ligador(es) de péptido. Un péptido ligador entre las porciones fusionadas puede proporcionar mayor separación física entre las porciones y de esta manera maximizan la accesibilidad de la porción de la proteína terapéutica, por ejemplo, por el enlace a su receptor cognado. El pitido ligador puede consistir de aminoácidos tal que es flexible o más rígido. La secuencia ligadora puede ser escindible por una proteasa o químicamente.

Como se utiliza en la presente, el término “región Fc” se refiere a la porción de una inmunoglobulina nativa formada por los dominios Fc respectivos (o porciones Fc) de sus dos cadenas pesadas. Como se utiliza en la presente, el término “dominio Fc” se refiere a una porción o fragmento de una cadena pesada de inmunoglobulina individual (Ig) en donde el dominio Fc no comprende un dominio Fv. En ciertas formas de realización, un dominio Fc comienza en la región bisagra justo cadena arriba del sitio de escisión de papaína y termina en la C-terminal del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En ciertas formas de realización, un dominio Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, intermedia y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4, o una variante, porción, o un fragmento del mismo. En ciertas formas de realización, un dominio Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3). En ciertas formas de realización, un dominio Fc comprende un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o porción del mismo). En ciertas formas de realización, un dominio Fc comprende un dominio CH2 (o porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o porción del mismo). En ciertas formas de realización, un dominio Fc consiste de un dominio CH3 o porción del mismo. En ciertas formas de realización, un dominio Fc consiste de un dominio bisagra (o porción del mismo) y un dominio CH3 (o porción del mismo). En ciertas formas de realización, un dominio Fc consiste de un dominio CH2 (o porción del mismo) y un dominio CH3. En ciertas formas de realización, un dominio Fc consiste de un dominio bisagra (o porción del mismo) y un dominio CH2 (o porción del mismo). En ciertas formas de realización, un dominio Fc carece al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Un dominio Fc se refiere en la presente en general a un polipéptido que comprende todo o parte del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Esto incluye, pero no se limita a, polipéptidos que comprenden los dominios CH1, bisagra, CH2, y/o CH3 completos así como fragmentos de estos péptidos que comprenden solo, por ejemplo, el dominio bisagra, CH2, y CH3. El dominio Fc se puede derivar de una inmunoglobulina de cualquier especie y/o cualquier subtipo, incluido, pero no limitado a, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM

humano. El dominio Fc abarca las moléculas de Fc y variantes Fc nativas. Como se expone en la presente, se entenderá por uno de experiencia ordinaria en la técnica que cualquier dominio Fc se puede modificar tal que varía en secuencias de aminoácidos del dominio Fc nativo de una molécula de inmunoglobulina de origen natural. En ciertas formas de
 5 realización, el dominio Fc tiene función efectora reducida (por ejemplo, unión FcγR).

Los dominios Fc de un polipéptido descrito en la presétese pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio Fc puede comprender una
 10 región bisagra quimérica derivada, en parte, molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio Fc puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

En ciertas formas de realización, un grupo PK extendido incluye un dominio Fc o fragmentos del mismo o variantes del dominio Fc o fragmentos del mismo (todos los cuales
 15 para el propósito de la presente descripción están comprendidos por el término “dominio Fc”). El dominio Fc no contiene una región variable que se une a un antígeno. Los dominios Fc adecuados para el uso en la presente descripción se pueden obtener de varias fuentes diferentes. En ciertas formas de realización, un dominio Fc se deriva de una inmunoglobulina humana. En ciertas formas de realización, el dominio Fc es de una región constante de IgG1
 20 humana. Se entiende, sin embargo, que el dominio Fc se puede derivar de una inmunoglobulina u otra especie de mamífero, incluido por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, conejillo de indias) o especie de primate no humano (por ejemplo, chimpancé, macaco).

Por otra parte, el dominio Fc (o un fragmento o variante del mismo) se puede derivar
 25 de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA, e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, incluidas IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

Una variedad de secuencias de genes de dominio Fc (por ejemplo, secuencias de genes de región constante de ratón y humana) están disponibles en la forma de depósito públicamente accesible. Se pueden seleccionar dominios de región constante que
 30 comprenden una secuencia de dominio Fc que carece de una función efectora particular y/o con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y genes de codificación de anticuerpo y secuencias de dominio Fc adecuadas (por ejemplo, secuencias bisagra, CH2 y/o CH3, o fragmentos o variantes de las mismas) se pueden derivar de estas secuencias utilizando técnicas reconocidas en el campo.

35 En ciertas formas de realización, el grupo PK extendido es una proteína de unión a albúmina en suero tal como aquellas descritas en US2005/0287153, US2007/0003549, US2007/0178082, US2007/0269422, US2010/0113339, WO2009/083804, y WO2009/133208,

que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. En ciertas formas de realización, el grupo PK extendido es transferina, como se describe en US 7,176,278 y US 8,158,579, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. En ciertas formas de realización, el grupo PK extendido es una proteína de unión de inmunoglobulina en suero tal como aquellas descritas en US2007/0178082, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En ciertas formas de realización, el grupo PK extendido es una proteína de dominio de andamiaje basada en fibronectina (Fn) que se une a la albúmina en suero, tal como aquellas descritas en US2012/0094909, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Los métodos para fabricar proteínas de dominio de andamiaje basadas en fibronectina también se describen en US2012/0094909. Un ejemplo no limitante de un grupo PK extendido basado en Fn3 es Fn3(HSA), es decir, una proteína Fn3 que se une a la albúmina en suero humano.

En ciertos aspectos, la IL PK extendida, adecuada para su uso de acuerdo con la descripción, puede emplear uno o más ligadores de péptido. Como se utiliza en la presente, el término “ligador de péptido” se refiere a una secuencia de péptidos o polipéptidos que conecta dos o más dominios (por ejemplo, porción de PK extendida y una porción de IL tal como IL2) en una secuencia de aminoácidos lineal de una cadena de polipéptidos. Por ejemplo, los ligadores de péptido se pueden utilizar para conectar una porción de IL2 a un dominio HSA.

Los ligadores adecuados para fusionar el grupo de PK extendido a por ejemplo IL2 son bien conocidos en la técnica. Los ligadores ejemplares incluyen ligadores de glicina-serina-polipéptido, ligadores de glicina-prolina-polipéptido y ligadores de prolina-alanina-polipéptido. En ciertas formas de realización, el ligador es un ligador de glicina-serina-polipéptido, es decir, un péptido que consiste de residuos de glicina y serina.

Además de, o en lugar de, los polipéptidos heterólogos descritos en lo anterior, un polipéptido variante de IL2 descrito en la presente puede contener secuencias que codifican un “marcador” o “informador”. Ejemplos de genes marcadores o informadores incluyen β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-hosfotransferasa (HPH), timidina cinasa (TK) β -galactosidasa, y xantina guanina fosforibosiltransferasa (XGPRT).

Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente pueden actuar en células efectoras inmunitarias que pueden estar presentes endógenamente en un sujeto o después de la administración de las células efectoras inmunitarias. Por consiguiente, las células efectoras inmunitarias se pueden proporcionar a un sujeto mediante administración de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células efectoras inmunitarias sin tratamiento previo o transgénicas de receptor de antígeno. Las “células efectoras inmunitarias” particularmente preferidas son células que, ya sea naturalmente o después de la transfección con ácido nucleico que codifica

uno o más polipéptidos de IL2R, son sensibles a IL2. Esta capacidad de respuesta incluye activación, diferenciación, proliferación, supervivencia e/o indicación de una o más funciones efectoras inmunitarias. Las células incluyen, en particular, células citotóxicas tal como células con potencial lítico, en particular células linfoides, y son de manera preferente células T, en particular células T efectoras, tal como linfocitos citotóxicos, seleccionados de manera preferente de células T citotóxicas, células exterminadoras naturales (NK), y células exterminadoras activadas por linfocinas (LAK). Tras la activación, estas células pueden desencadenar la destrucción de células objetivo. Por ejemplo, las células T citotóxicas activan la destrucción de las células objetivo por cualquiera o ambos de los siguientes medios.

Primero, tras la activación las células T liberan citotoxinas tal como perforina, granzimas, y granulisin. La perforina y granulisin crean poros en la célula objetivo, y las granzimas entran a la célula y activan una cascada de caspasa en el citoplasma que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. Segundo, la apoptosis se puede inducir a través de la interacción de Fas-ligando Fas entre las células T y las células objetivo. Las células utilizadas en relación con la presente invención serán de manera preferente células autólogas, aunque se pueden utilizar células heterólogas o células alogénicas.

El término “funciones efectoras” en el contexto de la presente invención incluye cualquiera de las funciones mediadas por los componentes del sistema inmunitario que resultan, por ejemplo, en el exterminio de células enfermas tal como células tumorales, o en la inhibición del crecimiento tumoral y/o inhibición del desarrollo del tumor, incluido inhibición de la diseminación tumoral y metástasis. De manera preferente, las funciones efectoras en el contexto de la presente invención son funciones efectoras mediadas por células T. Estas funciones comprenden en el caso de una célula T auxiliar (célula T CD4⁺) la liberación de citoquinas y/o la activación de linfocitos CD8⁺ (CTLs) y/o células B, y en el caso de CTL la eliminación de las células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, a través de apoptosis o lisis celular mediada por perforina, producción de citoquinas tal como IFN- γ y TNF- α , y exterminio citolítico específico de células objetivo que expresan antígeno.

El término “célula efectora inmunitaria” o “célula inmunoreactiva” en el contexto de la presente invención se refiere a una célula que ejerce funciones efectoras durante una reacción inmunitaria. Una “célula efectora inmunitaria” en una forma de realización es capaz de unir un antígeno tal como un antígeno presentado en el contexto de MHC en una célula o expresado sobre la superficie de una célula y median una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias comprenden células T (células T citotóxicas, células T auxiliares, células T infiltrantes de tumor), células B, células exterminadoras naturales, neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas. De manera preferente, en el contexto de la

presente invención, “células efectoras inmunitarias” son células T, de manera preferente células T CD4⁺ y/o CD8⁺. De acuerdo con la invención, el término “célula efectora inmunitaria” también incluye una célula que puede madurar en una célula inmunitaria (tal como célula T, en particular célula auxiliar T, o célula T citolítica) con estimulación adecuada. Las células efectoras inmunitarias comprenden células madre hematopoyéticas CD34⁺, células T inmaduras y maduras y células B inmaduras y maduras. La diferenciación de los precursores de células T en una célula T citolítica, cuando se expone a un antígeno, es similar a la selección clonal del sistema inmunitario.

De manera preferente, una “célula efectora inmunitaria” reconoce un antígeno con algún grado de especificidad, en particular si se presenta en el contexto de MHC o está presente en la superficie de las células enfermas tal como células cancerosas. De manera preferente, el reconocimiento permite que la célula que reconoce un antígeno sea sensible o reactiva. Si la célula es una célula T auxiliar (célula T CD4⁺), esta capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la liberación de citoquinas y/o la activación de linfocitos CD8⁺ (CTLs) y/o células B. Si la célula es un CTL, esta capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la eliminación de las células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, a través de apoptosis o lisis celular mediada por perforina. De acuerdo con la invención, la capacidad de respuesta de CTL puede incluir flujo de calcio sostenido, división celular, producción de citoquinas tal como IFN- γ y TNF- α , regulación por incremento de marcadores de activación tal como CD44 y CD69, y exterminio citolítico específico de células objetivo que expresan antígeno. La capacidad de respuesta de CTL también se puede determinar utilizando un informador artificial que indica con precisión la capacidad de respuesta de CTL. Esta CTL que reconoce un antígeno y es sensible o reactivo también es llamada “CTL sensible a antígeno” en la presente.

En una forma de realización, las células efectoras inmunitarias son células efectoras inmunitarias que expresan receptor de antígeno (por ejemplo, receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR)) En una forma de realización, las células efectoras inmunitarias son células efectoras inmunitarias que expresan CAR. En una forma de realización, las células efectoras inmunitarias son células efectoras inmunitarias que expresan TCR. En una forma de realización, las células efectoras inmunitarias son células efectoras inmunitarias transgénicas de receptor de antígeno (por ejemplo, receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR)).

Las células efectoras inmunitarias que se utilizan de acuerdo con la invención pueden expresar un receptor de antígeno endógeno tal como receptor de células T o receptor de células B o puede carecer de la expresión de un receptor de antígeno endógeno.

Una “célula linfoide” es una célula que, opcionalmente después de la modificación

adecuada, por ejemplo, después de la transferencia de un receptor de antígeno tal como un TCR o un CAR, es capaz de producir una respuesta inmunitaria tal como una respuesta inmunitaria celular, o una célula precursora de esta célula, e incluye linfocitos, de manera preferente linfocitos T, linfoblastos, y células plasmáticas. Una célula linfoide puede ser una

5 célula efectora inmunitaria como se describe en la presente. Una célula linfoide preferida es una célula T que se puede modificar para expresar un receptor de antígeno en la superficie celular. En una forma de realización, la célula linfoide carece de la expresión endógena de un receptor de células T.

Los términos “célula T” y “linfocito T” se utilizan intercambiabilmente en la presente e

10 incluyen células auxiliares T (células T $CD4^+$) y células T citotóxicas (CTLs, células T $CD8^+$) que comprenden células T citolíticas. El término “célula T específica de antígeno” o términos similares se refieren a una célula T que reconoce el antígeno al que la célula T se dirige y ejerce de manera preferente funciones efectoras de células T. Las células T se consideran que son específicas para el antígeno si las células exterminan células objetivo que expresan

15 un antígeno. La especificidad de la célula T se puede evaluar utilizando cualquiera de una variedad de técnicas estándares, por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación. Alternativamente, se puede medir la síntesis de linfocinas (tal como IFN- γ).

Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos, y

20 desempeñan una función central en la inmunidad mediada por célula. Se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, tal como células B y células exterminadoras naturales por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado receptor de células T (TCR). El timo es el órgano principal responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

Las células auxiliares T ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos

25 inmunológicos, incluida maduración de células B en las células plasmáticas y activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también son conocidas como células T $CD4^+$ debido a que expresan la glicoproteína CD4 sobre su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando se presentan con antígenos de péptido por las

30 moléculas MHC clase II que se expresan sobre la superficie de las células que presentan antígeno (APCs). Una vez activadas, se dividen rápidamente y secretan proteínas pequeñas llamadas citoquinas que regulan o ayudan en la respuesta inmunitaria activa.

Las células T citotóxicas destruyen células viralmente infectadas y células tumorales, y también se implican en el rechazo de trasplante. Estas células son conocidas también como

35 células T $CD8^+$ puesto que expresan la glicoproteína CD8 sobre su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con MHC clase I, que está presente en la superficie de casi cada célula del cuerpo.

Como se utiliza en la presente, el término “célula T efectora” o “T_{eff}” se refiere a células T que no son reguladoras e incluye células T auxiliares y células T citotóxicas. Además, el término “célula T efectora” o “T_{eff}” incluye células T activadas y células T no activadas y de esta manera, células que han encontrado antígeno y/o moléculas co-estimuladoras así como

5 células que no han encontrado antígeno y/o moléculas co-estimuladoras. De esta manera, el término “célula T efectora” también incluye células T sin tratamiento previo. Las células T expresan CD25 cuando se activan. De acuerdo con la invención, las células T efectoras pueden ser células T CD25⁺ o células T CD25⁻, y son de manera preferente células T CD25⁻.

Las “células T reguladoras”, “células T_{reg}” o “Tregs” son una subpoblación de células T

10 que modulan el sistema inmunitario, mantienen la tolerancia a los autoantígenos y previenen enfermedad autoinmunitaria. Las Tregs son inmunosupresoras y suprimen o regulan por decremento en general la inducción y proliferación de células T efectoras. Las Tregs expresan los biomarcadores CD4, FoxP3, y CD25.

Como se utiliza en la presente, el término “célula T sin tratamiento previo” se refiere a

15 células T maduras que, diferente a las células T activadas o de memoria, no han encontrado su antígeno cognado dentro de la periferia. Las células T sin tratamiento previo se caracterizan comúnmente por la expresión de superficie de la L-selectina (CD62L), la ausencia de los marcadores de activación CD25, CD44 o CD69 y la ausencia de la isoforma CD45RO de memoria.

Como se utiliza en la presente, el término “células T de memoria” se refiere a un subgrupo o subpoblación de células T que se han encontrado y han respondido previamente a su antígeno cognado. En un segundo encuentro con el antígeno, las células T de memoria pueden reproducirse para montar una respuesta inmunitaria más rápida y más potente que la primera vez el sistema inmunitario respondió al antígeno. Las células T de memoria pueden

20 ser ya sea CD4⁺ o CD8⁺ y usualmente expresan CD45RO.

Todas las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. En la mayoría de células T, el receptor de células T actual se compone de dos cadenas de péptidos separadas, que se producen de los genes del receptor de células T independientes alfa y beta (TCR α y TCR β) y son llamados cadenas α y β -TCR.

30 Un grupo mucho menos común (2% de células T totales) de células T, las células T $\gamma\delta$ (células T gamma-delta) posee un receptor de células T distinto (TCR) sobre su superficie, que está constituido de una cadena γ y una cadena δ .

Todas las células T se originan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas pueblan el

35 timo y se expanden por división celular para generar una población grande de timocitos inmaduros. Los timocitos tempranos no expresan CD4 tampoco CD8, y por lo tanto se clasifican como células doble negativas (CD4⁻CD8⁻). Ya que progresan a través de su

desarrollo se vuelven timocitos dobles positivos ($CD4^+CD8^+$), y finalmente maduran a timocitos positivos individuales ($CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$) que luego se liberan del timo a los tejidos periféricos.

Las células T se pueden preparar en general *in vitro* o *ex vivo*, utilizando procedimientos estándares. Por ejemplo, las células T se pueden aislar de médula ósea, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un mamífero, tal como un paciente, utilizando un sistema de separación celular comercialmente disponible. Alternativamente, las células T se pueden derivar de humanos relacionados o no relacionados, animales no humanos, líneas de células o cultivos. Una muestra que comprende células T puede, por ejemplo, ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Como se utiliza en la presente, el término “célula NK” o “célula Exterminadora Natural” se refiere a un subconjunto de linfocitos de sangre periférica definidos por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia del receptor de células T. Como se proporciona en la presente, la célula NK también puede ser diferenciada de una célula madre o célula progenitora.

Las células efectoras inmunitarias pueden expresar naturalmente o después de la modificación (por ejemplo, *ex vivo/in vitro* o *in vivo* en un sujeto a ser tratado), una IL2R o variante de IL2R. Además, las células efectoras inmunitarias pueden expresar naturalmente o después de la modificación (por ejemplo, *ex vivo/in vitro* o *in vivo* en un sujeto a ser tratado) un receptor de antígeno tal como un antígeno de unión a receptor de células T (TCR) o receptor de antígeno quimérico (CAR) o un producto de procesamiento del mismo, en particular cuando está presente en o presentado por una célula objetivo.

La terapia de transferencia celular adoptiva con células T modificadas con CAR que expresan receptores de antígeno quimérico es un agente terapéutico anticáncer prometedor ya que las células T modificadas con CAR se pueden modificar para dirigirse virtualmente a cualquier antígeno tumoral. Por ejemplo, las células T del paciente se pueden modificar genéticamente (modificar genéticamente) para expresar los CARs dirigidos específicamente hacia los antígenos en las células tumorales del paciente, luego se infunden de nuevo en el paciente.

El término “CAR” (o “receptor de antígeno quimérico”) es sinónimo con los términos “receptor de células T quimérico” y “receptor de células T artificiales” y se refiere a un receptor artificial que comprende una molécula individual o un complejo de moléculas que reconoce, es decir, se une a, una estructura objetivo (por ejemplo un antígeno) en una célula objetivo tal como una célula cancerosa (por ejemplo, por la unión de un dominio de unión a antígeno a un antígeno expresado en la superficie de la célula objetivo) y puede conferir especificidad en una célula efectora inmunitaria tal como una célula T que expresa el CAR en la superficie celular. De manera preferente, el reconocimiento de la estructura objetivo por un CAR da por resultado la activación de una célula efectora inmunitaria que expresa el CAR. Un CAR puede

comprender una o más unidades de proteína, las unidades de proteína comprenden uno o más dominios como se describe en la presente. El término “CAR” no incluye receptores de células T.

Un CAR comprende un elemento de unión específico objetivo de otra manera referido como una porción de unión a antígeno o dominio de unión a antígeno que es en general parte del dominio extracelular del CAR. El dominio de unión a antígeno reconoce un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en las células objetivo asociadas con un estado de enfermedad particular. Específicamente, el CAR se dirige al antígeno tal como antígeno tumoral en una célula enferma tal como célula tumoral.

En una forma de realización, el dominio de unión en el CAR se une específicamente al antígeno. En una forma de realización, el antígeno al cual el dominio de unión en el CAR se une se expresa en una célula cancerosa (antígeno tumoral). En una forma de realización, el antígeno se expresa sobre la superficie de una célula cancerosa. En una forma de realización, el dominio de unión se une a un dominio extracelular o a un epítipo en un dominio extracelular del antígeno. En una forma de realización, el dominio de unión se une a epítopos nativos del antígeno presente en la superficie de células vivas.

En una forma de realización, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una especificidad para el antígeno y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para el antígeno. En una forma de realización, una inmunoglobulina es un anticuerpo. En una forma de realización, la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera correspondiente (VL) se conectan a través de un ligador de péptido. De manera preferente, la parte de la porción de unión a antígeno en el CAR es un scFv.

El CAR está diseñado para comprender un dominio transmembrana que se fusiona al dominio extracelular del CAR. En una forma de realización, el dominio transmembrana no se asocia naturalmente con uno de los dominios en el CAR. En una forma de realización, el dominio transmembrana se asocia naturalmente con uno de los dominios en el CAR. En una forma de realización, el dominio transmembrana se modifica por la sustitución de aminoácidos para evitar la unión de estos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. El dominio transmembrana se puede derivar ya sea de una fuente natural o sintética. Donde la fuente es natural, el dominio se puede derivar de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta invención se pueden derivar de (es decir comprenden al menos la región(es) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo

caso comprenderá residuos predominantemente hidrofóbicos tal como leucina y valina. De manera preferente un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

En algunos casos, el CAR de la invención comprende un dominio bisagra que forma la
5 ligación entre el dominio transmembrana y el dominio extracelular.

El dominio citoplásmico o de otra manera el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la cual el CAR se ha colocado. El término “función efectora” se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo,
10 puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar que incluye la secreción de citoquinas. De esta manera el término “dominio de señalización intracelular” se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige la célula para llevar a cabo una función especializada. Usualmente mientras que se puede emplear el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar la cadena completa. Al grado en que
15 una porción truncada del dominio de señalización intracelular es utilizada, esta porción truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta siempre y cuando transduce la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular de esta manera propone incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la
20 activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o co-estimuladora. De esta manera, la activación de células T se puede decir que es mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplásmica: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización
25 citoplásmicas primaria) y aquellas que actúan de una manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o co-estimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias).

En una forma de realización, el CAR comprende una secuencia de señalización citoplásmica primaria derivada de CD3-zeta. Además, el dominio citoplásmico del CAR puede
30 comprender el dominio de señalización CD3-zeta combinado con una región de señalización co-estimuladora.

La identidad del dominio de co-estimulación se limita solo en que tiene la capacidad de mejorar la proliferación y supervivencia celular tras la unión de la porción objetivo para el CAR. Los dominios de co-estimulación adecuados incluyen CD28, CD137 (4-1BB), un miembro de
35 la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), CD134 (OX40), un miembro de la superfamilia TNFR de receptores, y CD278 (ICOS), una molécula co-estimuladora de la superfamilia CD28 expresada en las células T activadas. La persona experta entenderá que

las variantes de secuencia de estos dominios de co-estimulación observados se pueden utilizar sin impactar adversamente la invención, donde las variantes tienen la misma o similar actividad como el dominio en la cual se modelan. Estas variantes tendrán al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos del dominio del cual se derivan. En algunas formas de realización de la invención, los constructos de CAR comprenden dos dominios de co-estimulación. Mientras que las combinaciones particulares incluyen todas las posibles variaciones de los cuatro dominios observados, ejemplos específicos incluyen CD28+CD137 (4-1BB) y CD28+CD134 (OX40).

Las secuencias de señalización citoplásmicas dentro de la porción de señalización citoplásmica del CAR se puede ligar entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un ligador de oligo o polipéptido corto, de manera preferente entre 2 y 10 aminoácidos en longitud puede formar la ligación. Un doblete de glicina-serina proporciona un ligador particularmente adecuado.

En una forma de realización, el CAR comprende un péptido señal que dirige la proteína naciente al retículo endoplásmico. En una forma de realización, el péptido señal precede el dominio de unión a antígeno. En una forma de realización, el péptido señal se deriva de una inmunoglobulina tal como IgG.

El término “anticuerpo” incluye una inmunoglobulina que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por uniones de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinadoras de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que se conservan más, llamadas regiones de estructura (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas del amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores hospederos, incluidos varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Un anticuerpo se une, de manera preferente se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones o fragmentos inmunoreactivos de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas incluidas, por ejemplo,

anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena individual y anticuerpos humanizados (Harlow y colaboradores, 1999, en: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow y colaboradores, 1989, en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston y colaboradores, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird y colaboradores, 1988, *Science* 242:423-426).

Los anticuerpos expresados por las células B algunas veces son referidos como el receptor de BCR (receptor de células B) o de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD, e IgE. IgA es el anticuerpo principal que está presente en las secreciones corporales, tal como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de la mucosa de los tractos respiratorios y genitourinarios. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la inmunoglobulina principal producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de sujetos. Es la inmunoglobulina más eficiente en la aglutinación, fijación de complemento, y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que tiene función de anticuerpo no conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

Los anticuerpos se pueden derivar de diferentes especies, incluidas pero no limitadas a ratón, rata, conejo, conejillo de indias y humano.

Los anticuerpos descritos en la presente incluyen IgA tal como IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, y los anticuerpos IgD. En varias formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, de manera más particular un IgG1, kappa o IgG1, isotipo lambda (es decir IgG1, κ, λ), un anticuerpo IgG2a (por ejemplo IgG2a, κ, λ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo IgG2b, κ, λ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo IgG3, κ, λ), o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo IgG4, κ, λ).

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y típicamente comprende las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

Una “cadena pesada de anticuerpo”, como se utiliza en la presente, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en las moléculas de anticuerpo y sus conformaciones de origen natural.

Una “cadena ligera de anticuerpo”, como se utiliza en la presente, se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas de polipéptido presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural, las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos

isotipos principales de cadena ligera de anticuerpos.

De acuerdo con la descripción, un CAR que cuando está presente en una célula T reconoce un antígeno tal como en la superficie de células que presentan antígeno o células enfermas tal como células cancerosas, tal que la célula T es estimulada, y/o se expande o ejerce sus funciones efectoras como se describe en lo anterior.

Se puede utilizar una variedad de métodos para introducir polipéptidos del receptor de IL2 y/o receptores de antígeno tal como constructos CAR en células tal como células T para producir células modificadas genéticamente para expresar los polipéptidos del receptor de IL2 y/o receptores de antígeno. Estos métodos incluyen transfección de ADN basada no viral, transfección de ARN basada no viral, por ejemplo, transfección de ARNm, sistemas basados en transposones y sistemas basados virales. La transfección de ADN basada no viral tiene bajo riesgo de mutagénesis de inserción. Los sistemas basados en transposones pueden integrar transgenes más eficientemente que los plásmidos que no contienen un elemento de integración. Los sistemas basados virales incluyen el uso de retrovirus y vectores lentivirales. Los retrovirus son relativamente fáciles de producir, de manera eficiente y transducir permanente células T, y tienen seguridad preliminarmente probada desde un punto de vista de la integración en las células T humanas primarias. Los vectores lentivirales también transducen de manera eficiente y permanentemente células T, pero son más costosas de fabricar. También son potencialmente más seguros que los sistemas basados en retrovirus. En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, las células se transfectan ya sea ex vivo o in vivo con ácido nucleico que codifica el polipéptido del receptor de IL2 y/o ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno. En una forma de realización, se puede utilizar una combinación de transfección ex vivo e in vivo. Después de la modificación ex vivo, las células se pueden administrar a un sujeto que se trata.

En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, las células descritas en la presente pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas del sujeto que se trata. En una forma de realización, la presente descripción prevé el retiro de las células de un paciente y suministro subsecuente de las células (por ejemplo, modificadas y/o expandidas ex vivo) al paciente. En una forma de realización, la presente descripción no prevé el retiro de las células de un paciente. En el último caso, todos los pasos de modificación genética de las células se llevan a cabo in vivo.

El término “autólogo” se utiliza para describir cualquier cosa que se derive del mismo sujeto. Por ejemplo, “trasplante autólogo” se refiere a un trasplante de tejido u órganos derivados del mismo sujeto. Estos procedimientos son ventajosos debido a superan la barrera inmunológica que de otra manera da por resultado el rechazo.

El término “alogénico” se utiliza para describir cualquier cosa que se derive de diferentes individuos de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos

entre sí cuando los genes en uno o más sitios no son idénticos.

El término “singénico” se utiliza para describir cualquier cosa que se derive de individuos o tejidos que tienen genotipos idénticos, es decir, gemelos idénticos o animales de la misma raza endógama, o sus tejidos.

5 El término “heterólogo” se utiliza para describir cualquier cosa que consiste de múltiples elementos diferentes. Como un ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo en un individuo diferente constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta al sujeto.

10 La presente descripción también proporciona por la provisión, por ejemplo, administración, de una molécula de antígeno tal como un péptido o antígeno de proteína, por ejemplo para hacer contacto con las células efectoras inmunitarias, en particular células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno, por ejemplo, células efectoras inmunitarias que se manipulan genéticamente para expresar un receptor de antígeno, ya sea *ex vivo* o en el sujeto que se trata, con una molécula de antígeno cognada, en donde la
15 molécula de antígeno o un producto de procesamiento del mismo, por ejemplo, un fragmento de mismo, se une al receptor de antígeno tal como TCR o CAR llevado por las células efectoras inmunitarias. En una forma de realización, la molécula de antígeno cognado se selecciona del grupo que consiste del antígeno expresado por una célula objetivo a la cual las células efectoras inmunitarias se dirigen o un fragmento del mismo, o una variante del
20 antígeno o el fragmento. En una forma de realización, las células efectoras inmunitarias se ponen en contacto con la molécula de antígeno cognado bajo condiciones tal que se presenta la expansión y/o activación de las células efectoras inmunitarias. En una forma de realización, el paso de poner en contacto las células efectoras inmunitarias con la molécula de antígeno cognado se lleva a cabo *in vivo* o *ex vivo*.

25 Los antígenos de péptidos y proteínas adecuados para el uso de acuerdo con la descripción incluyen típicamente un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria. El péptido o proteína o epítipo se puede derivar de un antígeno objetivo, es decir, el antígeno contra el que se va a inducir una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el antígeno de péptido o proteína o el epítipo contenido dentro del antígeno de
30 péptido o proteína puede ser un antígeno objetivo o un fragmento o variante de un antígeno objetivo.

En una forma de realización, los métodos descritos en la presente comprenden el paso de administrar la molécula de antígeno o un ácido nucleico que codifica el mismo al sujeto. En una forma de realización, el ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno se expresa en
35 las células del sujeto para proporcionar la molécula de antígeno. En una forma de realización, la expresión de la molécula de antígeno está en la superficie celular. En una forma de realización, la molécula de antígeno se presenta en el contexto de MHC. En una forma de

realización, el ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno se expresa transitoriamente en las células del sujeto. En una forma de realización, el nucleico que codifica la molécula de antígeno es ARN. En una forma de realización, la molécula de antígeno o el ácido nucleico que codifica el mismo se administra sistémicamente. En una forma de realización, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno, se presenta la expresión del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno en el bazo. En una forma de realización, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno, se presenta la expresión del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno en las células que presentan antígeno, de manera preferente células que presentan antígeno profesionales. En una forma de realización, las células que presentan antígenos se seleccionan del grupo que consiste de células dendríticas, macrófagos y células B. En una forma de realización, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno, nada o esencialmente nada de expresión se presenta del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno en el pulmón y/o hígado. En una forma de realización, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno, la expresión del ácido nucleico que codifica la molécula de antígeno en el bazo es al menos 5 veces la cantidad de expresión en el pulmón.

Un antígeno de péptido y proteína que se proporciona a un sujeto de acuerdo con la invención (ya sea al administrar el antígeno de péptido o proteína o un ácido nucleico, en particular ARN, que codifica el antígeno de péptido y proteína), es decir, un antígeno de vacuna, da por resultado de manera preferente en estimulación, cebado y/o expansión de las células efectoras inmunitarias en el sujeto se administra el antígeno de péptido o proteína o ácido nucleico. Las células efectoras inmunitarias estimuladas, cebadas y/o expandidas están de manera preferente dirigidas contra un antígeno objetivo, en particular un antígeno objetivo expresado por células enfermas, tejidos y/u órganos, es decir, un antígeno asociado a enfermedad. De esta manera, un antígeno de vacuna puede comprender el antígeno asociado a la enfermedad, o un fragmento o variante del mismo. En una forma de realización, este fragmento o variante de es inmunológicamente equivalente al antígeno asociado a la enfermedad. En el contexto de la presente descripción, el término “fragmento de un antígeno” o “variante de un antígeno” significa un agente que da por resultado estimulación, cebado y/o expansión de células efectoras inmunitarias que las células efectoras inmunitarias estimulada, cebadas y/o expandidas se dirigen al antígeno, es decir, un antígeno asociado a enfermedad, en particular cuando se presentan en las células enfermas, tejidos y/o órganos. De esta manera, el antígeno de vacuna puede corresponder a o puede comprender el antígeno asociado a enfermedad, puede corresponder a o puede comprender un fragmento del antígeno asociado a enfermedad o puede corresponder a o puede comprender un antígeno que es homólogo al antígeno asociado a enfermedad o un fragmento del mismo. Si el

antígeno de vacuna comprende un fragmento del antígeno asociado a enfermedad o una secuencia de aminoácidos que es homóloga a un fragmento del antígeno asociado a enfermedad, el fragmento o secuencia de aminoácidos puede comprender un epítopo del antígeno asociado a enfermedad o una secuencia que es homólogo a un epítopo del antígeno asociado a la enfermedad. De esta manera, de acuerdo con la descripción, un antígeno de 5 vacuna puede comprender un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a una enfermedad o una secuencia de aminoácidos que se homóloga a un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a enfermedad. Un “fragmento inmunogénico de un antígeno” de acuerdo con la descripción se refiere de manera preferente a un fragmento de un antígeno 10 que es capaz de estimular, cebar y/o expandir células efectoras inmunitarias que llevan un receptor de antígeno que se une al antígeno o células que expresan el antígeno. Se prefiere que el antígeno de vacuna (similar al antígeno asociado a enfermedad) proporcione el epítopo relevante por la unión por el dominio de unión al antígeno presente en las células efectoras inmunitarias. En una forma de realización, el antígeno de vacuna (similar al antígeno asociado 15 a enfermedad) se expresa en la superficie de una célula tal como una célula que presenta de antígeno para proporcionar de esta manera el epítopo relevante para la unión por las células efectoras inmunitarias. El antígeno de la vacuna puede ser un antígeno recombinante.

En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, el ácido nucleico que codifica el antígeno de vacuna se expresa en las células de un sujeto que proporciona el 20 antígeno o producto de procesamiento del mismo para la unión por el receptor de antígeno expresado por las células efectoras inmunitarias, la unión da por resultado estimulación, cebado y/o expansión de las células efectoras inmunitarias.

El término “inmunológicamente equivalente” significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente 25 equivalente muestra las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo del efecto inmunológico. En el contexto de la presente descripción, el término “inmunológicamente equivalente” se utiliza de manera preferente con respecto a los efectos o propiedades inmunológicas de los antígenos o variantes de antígenos utilizados para 30 inmunización. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos de referencia si la secuencia de aminoácidos cuando se expone al sistema inmunitario de un sujeto tal como las células T que se une a la secuencia de aminoácidos de referencia o células que expresan la secuencia de aminoácidos de referencia induce una reacción inmunitaria que tiene una especificidad de reaccionar con la 35 secuencia de aminoácidos de referencia. De esta manera, una molécula que es inmunológicamente equivalente a un antígeno muestra las mismas o esencialmente las mismas propiedades y/o ejerce las mismas o esencialmente los mismos efectos con respecto

a la estimulación, cebado y/o la expansión de células T como el antígeno al cual se dirigen las células T.

“Activación” o “estimulación”, como se utiliza en la presente, se refiere al estado de una célula efectora inmunitaria tal como célula T que se ha estimulado de manera suficiente para inducir una proliferación celular detectable. La activación también se puede asociar con el inicio de las rutas de señalización, la producción de citocinas inducida y funciones efectoras detectables. El término “células efectoras inmunitarias activadas” se refiere, entre otras cosas, células efectoras inmunitarias que están sometiendo a división celular.

El término “cebado” se refiere a un proceso en donde una célula efectora inmunitaria tal como una célula T tiene su primer contacto con su antígeno específico y provoca diferenciación en las células efectoras tal como células T efectoras.

El término “expansión clonal” o “expansión” se refiere a un proceso en donde se multiplica una entidad específica. En el contexto de la presente descripción, el término se utiliza de manera preferente en el contexto de una respuesta inmunológica en la cual los linfocitos se estimulan por un antígeno, proliferan y se amplifica el linfocito específico que reconoce dicho antígeno. De manera preferente, la expansión clonal conduce a la diferenciación de los linfocitos.

El término “antígeno” se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se puede generar una respuesta inmunitaria. El término “antígeno” incluye, en particular, proteínas y péptidos. En una forma de realización, un antígeno se presenta o está presente en la superficie de células del sistema inmunitario tal como células que presentan antígeno como células dendríticas o macrófagos. Un antígeno o producto de procesamiento del mismo, tal como un epítipo de células T, está en una forma de realización por un receptor de antígeno. Por consiguiente, un antígeno o producto de procesamiento del mismo puede reaccionar específicamente con células efectoras inmunitarias tal como linfocitos T (células T). En una forma de realización, un antígeno es un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno tumoral, un antígeno viral o un antígeno bacteriano y un epítipo se deriva de este antígeno.

El término “antígeno asociado a una enfermedad” se utiliza en su sentido más amplio para referirse a cualquier antígeno asociado con una enfermedad. Un antígeno asociado a enfermedad es una molécula que contiene epítopos que estimularán el sistema inmunitario de un hospedero para hacer una respuesta inmunitaria específica de antígeno celular y/o respuesta a anticuerpo humoral contra la enfermedad. Por tanto, el antígeno asociado a enfermedad o un epítipo del mismo se puede utilizar para propósitos terapéuticos. Los antígenos asociados a enfermedades se pueden asociar con infección por microbios, típicamente antígenos microbianos, o asociados con cáncer, típicamente tumores.

El término “antígeno tumoral” se refiere a un constituyente de células cancerosas que

se pueden derivar del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular. en particular, se refiere a aquellos antígenos que se producen intracelularmente o como antígenos de superficie en las células tumorales. Un antígeno tumoral se expresa típicamente de manera preferente por células cancerosas (por ejemplo, se expresa en niveles más altos en las células cancerosas que en las células no cancerosas) y en algunos casos se expresa solamente por las células cancerosas. Ejemplos de antígenos tumorales incluyen, sin limitación, p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1 , CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, las proteínas de superficie celular de la familia claudina, tal como CLAUDIN-6, CLAUDIN-18.2 y CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, de manera preferente MAGE-A1 , MAGE-A2, MAGE- A3, MAGE-A4, MAGE- A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A 10, MAGE-A 11, o MAGE- A12, MAGE-B, MAGE-C, MART- 1 /Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1 , MUM-1 , MUM -2, MUM -3, NA88-A, NF1 , NY-ESO-1 , NY-BR-1 , pl90 menor BCR-abL, Pml/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1 , SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1 , TPI/m, TRP-1 , TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT, y WT-1.

El término “antígeno viral” se refiere a cualquier componente viral que tenga propiedades antigénicas, es decir que sea capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un individuo. El antígeno viral puede ser una ribonucleoproteína viral o una proteína de la envoltura.

El término “antígeno bacteriano” se refiere a cualquier componente bacteriano que tenga propiedades antigénicas, es decir que sea capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un individuo. El antígeno bacteriano se puede derivar de la pared celular o la membrana del citoplasma de la bacteria.

El término “expresado en la superficie celular” o “asociado con la superficie celular” significa que la molécula tal como un receptor o antígeno se asocia y se sitúa en la membrana plasmática de una célula, en donde al menos una parte de la molécula se orienta al espacio extracelular de la célula y es accesible desde el exterior de la célula, por ejemplo, por anticuerpos situados fuera de la célula. En este contexto, una parte es de manera preferente al menos 4, de manera preferente al menos 8, de manera preferente al menos 12, de manera más preferente al menos 20 aminoácidos. La asociación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la asociación puede ser por cualquiera de uno o más dominios transmembrana, uno o más anclajes lipídicos, o por la interacción con cualquier otra proteína, lípido, sacárido u otra estructura que se pueda encontrar en la valva exterior de la membrana plasmática de una celda. Por ejemplo, una molécula asociada con la superficie de una célula puede ser una proteína transmembrana que tiene una porción extracelular o puede ser una proteína asociada con la superficie de una célula al interactuar con otra proteína que es una proteína

transmembrana.

“Superficie celular” o “superficie de una célula” se utilizan usa de acuerdo con su significado normal en la técnica y de esta manera incluyen el exterior de la célula que es accesible a la unión por las proteínas y otras moléculas.

5 El término “porción extracelular” o “exodominio” en el contexto de la presente invención se refiere a una parte de una molécula tal como una proteína que está orientándose en espacio extracelular de una célula y de manera preferente accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, al unir las moléculas tal como anticuerpos situados fuera de la célula. De manera preferente, el término se refiere a uno o más bucles o dominios extracelulares o un
10 fragmento de los mismos.

El término “epítopo” se refiere a una parte o fragmento de una molécula tal como un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario. Por ejemplo, el epítopo puede ser reconocido por células T, células B o anticuerpos. Un epítopo de un antígeno puede incluir una porción continua o discontinua del antígeno y puede estar entre alrededor de 5 y
15 alrededor de 100, tal como entre alrededor de 5 y alrededor de 50, de manera más preferente entre alrededor de 8 y alrededor de 30, de manera mucho más preferente alrededor de 10 y alrededor de 25 aminoácidos en longitud, por ejemplo, el epítopo puede ser de manera preferente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos en longitud. En una forma de realización, un epítopo es entre alrededor de 10 y alrededor de 25
20 aminoácidos en longitud. El término “epítopo” incluye epítopos de células T.

El término “epítopo de células T” se refiere a una parte o fragmento de una proteína que es reconocida por una célula T cuando se presenta en el contexto de moléculas MHC. El término “complejo mayor de histocompatibilidad” y la abreviatura “MHC” incluye moléculas MHC clase I y MHC clase II y se refiere a un complejo de genes que está presente en todos
25 los vertebrados. Las proteínas o moléculas MHC son importantes para señalización entre linfocitos y células que presentan antígenos o células enfermas en reacciones inmunitarias, en donde las proteínas o moléculas de MHC unen los epítopos de péptidos y los presentan para reconocimiento por los receptores de células T en células T. Las proteínas codificadas por el MHC se expresan sobre la superficie de las células y muestran tanto autoantígenos propios
30 (fragmentos de péptidos de la misma célula) y de autoantígenos no propios (por ejemplo, fragmentos para invadir microorganismos) a una célula T. En el caso de los complejos de MHC / péptido clase I, los péptidos de unión son típicamente de alrededor de 8 a alrededor de 10 aminoácidos de largo, aunque pueden ser eficaces péptidos más largos o más cortos. En el caso de complejos de MHC/péptido clase II, los péptidos de unión son típicamente de
35 alrededor de 10 a alrededor de 25 aminoácidos de largo y son en particular de alrededor de 13 a alrededor de 18 aminoácidos de largo, mientras que los péptidos más largos y más cortos pueden ser eficaces.

En una forma de realización, el antígeno objetivo es un antígeno tumoral y el péptido o proteína que comprende un epítipo o a fragmento del mismo (por ejemplo, un epítipo) se deriva del antígeno tumoral. El antígeno tumoral puede ser “estándar” que es conocido generalmente por ser expresado en varios cánceres. El antígeno tumoral también puede ser un “neo-antígeno”, que es eficaz para el tumor de un individuo y no ha sido reconocido previamente por el sistema inmunitario. Un neoantígeno o neoepítipo puede resultar de una o más mutaciones específicas de cáncer en el genoma de las células cancerosas que dan por resultado cambios de aminoácidos. Si el antígeno tumoral es un neoantígeno, el péptido o proteína que comprende un epítipo comprende de manera preferente un epítipo o un fragmento del neoantígeno que comprende uno o más cambios de aminoácidos.

Las mutaciones cancerosas pueden variar con cada individuo. De esta manera, las mutaciones cancerosas que codifican los epítopos novedosos (neoepítopos) representan objetivos atractivos en el desarrollo de composiciones de vacunas e inmunoterapias. La eficacia de la inmunoterapia tumoral depende de la selección de antígenos y epítopos específicos del cáncer capaces de inducir una respuesta inmunitaria potente con un hospedero. El ARN se puede utilizar para administrar epítopos tumorales específicos de paciente a un paciente. Las células dendríticas (DC) que residen en el bazo representan células que presentan antígeno de interés particular para la expresión de ARN de los epítopos o antígenos inmunogénicos tal como epítopos tumorales. El uso de múltiples epítopos ya mostrado que promueve la eficacia terapéutica en las composiciones de vacuna tumoral. La rápida secuenciación del mutanoma tumoral puede proporcionar múltiples epítopos para las vacunas individualizadas que se pueden codificar por el ARN descrito en la presente, por ejemplo, como un único polipéptido en donde los epítopos se separan opcionalmente por ligadores. En ciertas formas de realización de la presente descripción, el ARN codifica al menos un epítipo, al menos dos epítopos, al menos tres epítopos, al menos cuatro epítopos, al menos cinco epítopos, al menos seis epítopos, al menos siete epítopos, al menos ocho epítopos, al menos nueve epítopos, o al menos diez epítopos. Las formas de realización ejemplares incluyen ARN que codifica al menos cinco epítopos (llamados un “pentatopo”) y el ARN que codifica al menos diez epítopos (llamados un “decatopo”).

De acuerdo con los diversos aspectos de la invención, el objetivo es de manera preferente proporcionar una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan un antígeno tumoral y para tratar una enfermedad cancerosa que implica células que expresan un antígeno tumoral. De manera preferente, la invención implica la administración de células efectoras inmunitarias tal como células T dirigidas contra células cancerosas que expresan un antígeno tumoral y/o antígeno de vacuna reconocido por estas células.

El antígeno de péptido y proteína puede ser 2-100 aminoácidos, incluidos por ejemplo, 5 aminoácidos, 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, 25 aminoácidos, 30

aminoácidos, 35 aminoácidos, 40 aminoácidos, 45 aminoácidos, o 50 aminoácidos en longitud. En algunas formas de realización, un péptido puede ser mayor de 50 aminoácidos. En algunas formas de realización, el péptido puede ser mayor de 100 aminoácidos.

El antígeno de péptido o proteína puede ser cualquier péptido o proteína que puede inducir o incrementar la capacidad del sistema inmunitario para desarrollar anticuerpos y respuestas de células T a péptido o proteína. En una forma de realización, el antígeno de vacuna es reconocido por una célula efectora inmunitaria. De manera preferente, el antígeno de vacuna, es reconocido por una célula efectora inmunitaria que es capaz de inducir en la presencia de señales co-estimuladoras apropiadas, estimulación, cebado y/o expansión de la célula efectora inmunitaria que lleva el receptor de antígeno que reconoce el antígeno de vacuna. En el contexto de las formas de realización de la presente invención, el antígeno de vacuna se presenta de manera preferente o está presente sobre la superficie de una célula, de manera preferente una célula que presenta antígeno. El reconocimiento de un antígeno asociado a una enfermedad sobre la superficie de una célula enferma por las células efectoras inmunitarias puede dar por resultado una reacción inmunitaria contra el antígeno (o la célula que expresa el antígeno).

En ciertas formas de realización, los inhibidores de punto de control inmunitarios se utilizan en combinación con otros agentes terapéuticos descritos en la presente (por ejemplo, ARN que codifica un polipéptido variante de interleucina (IL)-2 y opcionalmente ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo).

Como se utiliza en la presente, “punto de control inmunitario” se refiere a las señales co-estimuladoras e inhibidoras que regulan la amplitud y calidad del reconocimiento del receptor de células T de un antígeno. En ciertas formas de realización, el punto de control inmunitario es una señal inhibitoria. En ciertas formas de realización, la señal inhibitoria es la interacción entre PD-1 y PD-L1. En ciertas formas de realización, la señal inhibidora es la interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86 para desplazar la unión de CD28. En ciertas formas de realización la señal inhibidora es la interacción entre LAG3 y las moléculas MHC clase II. En ciertas formas de realización, la señal inhibitoria es la interacción entre TIM3 y galectina 9.

Como se utiliza en la presente, “inhibidor de punto de control inmunitario” se refiere a una molécula que reduce, inhibe, interfiere o total o parcialmente con o modula una o más proteínas de punto de control. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario impide que las señales inhibitorias se asocien con el punto de control inmunitario. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo, o un fragmento del mismo que altera la señalización inhibitoria asociada con el punto de control inmunitario. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es una molécula pequeña que altera la señalización inhibidora. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento del

mismo, o imitación de anticuerpo, que impide la interacción entre las proteínas bloqueadoras de punto de control, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo, que impide la interacción entre PD-1 y PD-L1. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que impide la interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que impide la interacción entre LAG3 y sus ligandos, o TIM-3 y sus ligandos. El inhibidor del punto de control también puede estar en la forma soluble de las moléculas mismas (o variantes de las mismas), por ejemplo, una PD-L1 soluble o fusión de PD-L1.

El recupero de “Muerte Programada 1 (PD-1)” se refiere a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. La PD-1 se expresa predominantemente en las células T previamente activadas *in vivo*, y se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. El término “PD-1” como se utiliza en la presente incluye PD-1 humana (hPD-1), variantes, isoformas, y especies y homólogos de especie de la hPD-1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-1.

“Ligando de Muerte Programada 1 (PD-L1)” es uno de los dos ligandos de glicoproteínas de superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regula por decremento la activación de células T y la secreción de citoquinas tras la unión a PD-1. El término “PD-L1” como se utiliza en la presente incluye PD-L1 humana (hPD-L1), variantes, isoformas, y homólogos de especie de hPD-L1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-L1.

“Antígeno Asociado a Linfocito T Citotóxico 4 (CTLA-4)” es una molécula de superficie de células T y es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Esta proteína regula por decremento el sistema inmunitario al unirse a CD80 y CD86. El término “CTLA-4” como se utiliza en la presente incluye CTLA-4 humana (hCTLA-4), variantes, isoformas, y homólogos de especie de hCTLA-4, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCTLA-4.

“Gen de Activación de Linfocitos 3 (LAG3)” es un receptor inhibidor asociado con la inhibición de la actividad de linfocitos al unirse a las moléculas MHC clase II. Este receptor mejora la función de las células Treg e inhibe la función de las células T efectoras de CD8+. El término “LAG3” como se utiliza en la presente incluye LAG3 humana (hLAG3), variantes, isoformas, y especies homólogos de hLAG3, y análogos que tienen al menos un epítipo común.

“Proteína de Membrana de Células 3 (TIM3)” es un receptor inhibidor implicado con la inhibición de la actividad de linfocitos por la inhibición de la respuesta de células TH1. Su ligando es galectina 9, que se regula por incremento en varios tipos de cánceres. El término “TIM3” como se utiliza en la presente incluye TIM3 humana (hTIM3), variantes, isoformas, y homólogos de especie de hTIM3, y análogos que tienen al menos un epítipo común.

La “familia B7” se refiere a ligandos inhibidores con receptores no definidos. La familia B7 abarca B7-H3 y B7-H4, ambos regulados por incremento en las células tumorales y células infiltrantes tumorales.

En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario para el uso en los métodos descritos en la presente, es un antagonista de las señales inhibitoras, por ejemplo, un anticuerpo que se dirige, por ejemplo, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, B7-H3, B7-H4, o TIM3. Estos ligandos y receptores se revisan en Pardoll, D., Nature. 12: 252-264, 2012.

En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, que altera o inhibe la señalización de un inmunoregulador inhibidor. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control inmunitario es una molécula pequeña que altera o inhibe la señalización de un inmunoregulador inhibidor.

En ciertas formas de realización, el inmunoregulador inhibidor es un componente de la ruta de señalización PD-1/PD-L1. Por consiguiente, en ciertas formas de realización de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que altera la interacción entre el receptor de PD-1 y su ligando, PD-L1. Los anticuerpos que se unen a PD-1 y altera la interacción entre la PD-1 y su ligando, PD-L1, se conocen en la técnica. En ciertas formas de realización, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PD-1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, incrementando de esta manera la actividad inmunitaria.

En ciertas formas de realización, el inmunoregulador inhibidor es un componente de la ruta de señalización CTLA4. Por consiguiente, ciertas formas de realización de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a CTLA4 y altera su interacción con CD80 y CD86.

En ciertas formas de realización, el inmunoregulador inhibidor es un componente de la ruta de señalización LAG3 (gen de activación de linfocitos 3). Por consiguiente, ciertas formas de realización de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a LAG3 y altera su interacción con las moléculas MHC clase II.

En ciertas formas de realización, el inmunoregulador inhibidor es un componente de la ruta de señalización de la familia B7. En ciertas formas de realización, los miembros de la familia B7 son B7-H3 y B7-H4. Por consiguiente, ciertas formas de realización de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a B7-H3 o H4. La familia B7 no tiene ninguno de los receptores definidos pero estos ligandos se regulan por incremento en las células tumorales o células infiltrantes tumorales. Los modelos de ratón preclínicos han mostrado que el bloqueo

de estos ligandos puede mejorar la inmunidad antitumoral.

En ciertas formas de realización, el inmunoregulador inhibidor es un componente de la ruta de señalización TIM3 (proteína de membrana de células T 3). Por consiguiente, ciertas formas de realización de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a TIM3 y altera su interacción con galectina 9.

Se entenderá por uno de experiencia ordinaria en la técnica que otros objetivos de punto de control inmunitarios también pueden ser orientados por antígenos o anticuerpos, con la condición de que el direccionamiento de por resultado la estimulación de una respuesta inmunitaria tal como una respuesta inmunitaria antitumoral como es reflejado en, por ejemplo, un incremento en la proliferación de células T, activación de células T mejorada, y/o producción de citoquinas mejorada (por ejemplo, IFN- γ , IL2).

Se prefiere particularmente de acuerdo con la invención que los péptidos, proteínas o polipéptidos descritos en la presente, en particular los polipéptidos variantes de IL2 y/o antígenos de vacuna, se administren en la forma de ARN que codifica los péptidos, proteínas o polipéptidos descritos en la presente. En una forma de realización, diferentes péptidos, proteínas o polipéptidos descritos en la presente se codifican por las moléculas de ARN diferentes.

En una forma de realización, el ARN se formula en un vehículo de suministro. En una forma de realización, el vehículo de suministro comprende partículas. En una forma de realización, el vehículo de suministro comprende al menos un lípido. En una forma de realización, el al menos un lípido comprende al menos un lípido catiónico. En una forma de realización, el lípido forma un complejo con y/o encapsula el ARN. En una forma de realización, el lípido está comprendido en una vesícula que encapsula el ARN. En una forma de realización, el ARN se formula en liposomas.

De acuerdo con la descripción, después de la administración del ARN descrito en la presente, al menos una porción del ARN se suministra en una célula objetivo. En una forma de realización, al menos una porción del ARN se suministra al citosol de la célula objetivo. En una forma de realización, el ARN se traduce por la célula objetivo para producir el péptido codificado o proteína.

Algunos aspectos de la descripción implican el suministro objetivo del ARN descrito en la presente (ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 y/o un ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítopo).

En una forma de realización, la descripción implica direccionamiento al sistema linfático, en particular los órganos linfoides secundarios, más específicamente el bazo. El direccionamiento del sistema linfático, en particular órganos linfoides secundarios, más específicamente el bazo es en particular preferido si el ARN administrado es ARN que codifica

un péptido o proteína que comprende un epítipo.

En una forma de realización, la célula objetivo es una célula del bazo. En una forma de realización, la célula objetivo es una célula que presenta antígeno tal como una célula que presenta antígeno profesional en el bazo. En una forma de realización, la célula objetivo es una célula dendrítica en el bazo.

El “sistema linfático” es parte del sistema circulatorio y una parte importante del sistema inmunitario, que comprende una red de vasos linfáticos que llevan linfa. El sistema linfático consiste de órganos linfáticos, una red conductora de vasos linfáticos, y la linfa circulante. Los órganos linfoides primarios o centrales generan linfocitos de células progenitoras inmaduras. El timo y la médula ósea constituyen los órganos linfoides principales. Los órganos linfoides secundarios o periféricos, que incluyen ganglios linfáticos y el bazo, mantienen los linfocitos sin tratamiento previo o maduros e inician una respuesta inmunitaria adaptiva.

El ARN se puede suministrar al bazo por las así llamadas formulaciones lipoplex, en las cuales el ARN se une a los liposomas que comprenden un lípido catiónico y opcionalmente un lípido adicional o auxiliar para formar formulaciones de nanopartículas inyectables. Los liposomas se pueden obtener la inyectar una solución de los lípidos en etanol en agua o una fase acuosa adecuada. Las partículas de lipoplex de ARN se pueden preparar al mezclar los liposomas con ARN. Las partículas de lipoplex de ARN de direccionamiento al bazo se describen en WO 2013/143683, incorporado en la presente por referencia. Se ha encontrado que las partículas de lipoplex de ARN que tienen una carga negativa neta se pueden utilizar para dirigirse de manera preferente al tejido del bazo o células del bazo, tal como células que presentan antígeno, en particular células dendríticas. Por consiguiente, después de la administración de las partículas de lipoplex de ARN, se presenta la acumulación de ARN y/o expresión de ARN en el bazo. De esta manera, las partículas de lipoplex de ARN de la descripción se pueden utilizar para expresar el ARN en el bazo. En una forma de realización, después de la administración de las partículas de lipoplex de ARN, nada o esencialmente nada de acumulación de ARN y/o expresión de ARN se presenta en el pulmón y/o hígado. En una forma de realización, después de la administración de las partículas de lipoplex de ARN, se presenta la acumulación y/o expresión en las células que presentan antígeno, tal como células que presentan antígeno profesionales en el bazo. De esta manera, las partículas de lipoplex de ARN de la descripción se pueden utilizar para expresar ARN en estas células que presentan antígeno. En una forma de realización, las células que presentan antígeno son células dendríticas y/o macrófagos.

En el contexto de la presente descripción, el término “partícula de lipoplex de ARN” se refiere a una partícula que contiene lípido, en particular lípido catiónico, y ARN. Las interacciones electrostáticas entre liposomas positivamente cargados y ARN negativamente

cargado da por resultado la formación en complejo y la formación espontánea de las partículas de lipoplex de ARN. Los liposomas positivamente cargados se pueden sintetizar en general utilizando un lípido catiónico, tal como DOTMA, y lípidos adicionales, tal como DOPE. En una forma de realización, una partícula de lipoplex de ARN es una nanopartícula.

5 Como se utiliza en la presente, un “lípido catiónico” se refiere a un lípido que tiene una carga positiva neta. Los lípidos catiónicos se unen negativamente al ARN cargado por interacción electrostática a la matriz lipídica. En general, los lípidos catiónicos poseen una porción lipofílica, tal como un esteroil, una cadena de acilo o diacilo, y el grupo principal del lípido lleva típicamente la carga positiva. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero no se
10 limitan a, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), dimetildioctadecilamonio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP); 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio propanos; 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamonio propanos; cloruro de dioctadecildimetil amonio (DODAC), 2,3-di(tetradecoxi)propil-(2-hidroxietil)-
15 dimetilazanio (DMRIE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano (DMTAP), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DORIE), y trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(espermina carboxamida)etil]-N,N-dimetil-l-propanamio (DOSPA). Se prefieren DOTMA, DOTAP, DODAC, y DOSPA. En formas de realización específicas, el lípido catiónico es DOTMA y/o DOTAP.

 Se puede incorporar un lípido adicional para ajustar la relación de carga positiva a
20 negativa general y la estabilidad física de las partículas de lipoplex de ARN. En ciertas formas de realización, el lípido adicional es un lípido neutro. Como se utiliza en la presente, un “lípido neutro” se refiere a un lípido que tiene una carga neta de cero. Ejemplos de lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a, 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidil colina, diacilfosfatidil etanol amina,
25 ceramida, esfingoemielina, cefalina, colesterol y cerebrósido. En formas de realización específicas, el lípido adicional es DOPE, colesterol y/o DOPC.

 En ciertas formas de realización, las partículas de lipoplex de ARN incluyen tanto un lípido catiónico como un lípido adicional. En una forma de realización ejemplar, el lípido catiónico es DOTMA y el lípido adicional es DOPE.

30 En algunas formas de realización, la relación molar del al menos un lípido catiónico a al menos un lípido adicional es de alrededor de 10:0 a alrededor de 1:9, alrededor de 4:1 a alrededor de 1:2, o alrededor de 3:1 a alrededor de 1:1. En formas de realización específicas, la relación molar puede ser alrededor de 3:1, alrededor de 2.75:1, alrededor de 2.5:1, alrededor de 2.25:1, alrededor de 2:1, alrededor de 1.75:1, alrededor de 1.5:1, alrededor de
35 1.25:1, o alrededor de 1:1. En una forma de realización ejemplar, la relación molar del al menos un lípido catiónico a al menos un lípido adicional es alrededor de 2:1.

 Las partículas de lipoplex de ARN descritas en la presente tienen un diámetro

promedio que en una forma de realización varía de alrededor de 200 nm a alrededor de 1000 nm, de alrededor de 200 nm a alrededor de 800 nm, de alrededor de 250 a alrededor de 700 nm, de alrededor de 400 a alrededor de 600 nm, de alrededor de 300 nm a alrededor de 500 nm, o de alrededor de 350 nm a alrededor de 400 nm. En formas de realización específicas,

5 las partículas de lipoplex de ARN tienen un diámetro promedio de alrededor de 200 nm, alrededor de 225 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 275 nm, alrededor de 300 nm, alrededor de 325 nm, alrededor de 350 nm, alrededor de 375 nm, alrededor de 400 nm, alrededor de 425 nm, alrededor de 450 nm, alrededor de 475 nm, alrededor de 500 nm, alrededor de 525 nm, alrededor de 550 nm, alrededor de 575 nm, alrededor de 600 nm,

10 alrededor de 625 nm, alrededor de 650 nm, alrededor de 700 nm, alrededor de 725 nm, alrededor de 750 nm, alrededor de 775 nm, alrededor de 800 nm, alrededor de 825 nm, alrededor de 850 nm, alrededor de 875 nm, alrededor de 900 nm, alrededor de 925 nm, alrededor de 950 nm, alrededor de 975 nm, o alrededor de 1000 nm. En una forma de realización, las partículas de lipoplex de ARN tienen un diámetro promedio que varía de

15 alrededor de 250 nm a alrededor de 700 nm. En otra forma de realización, las partículas de lipoplex de ARN tienen un diámetro promedio que varía de alrededor de 300 nm a alrededor de 500 nm. En una forma de realización ejemplar, las partículas de lipoplex de ARN tienen un diámetro promedio de alrededor de 400 nm.

La carga eléctrica de las partículas de lipoplex de ARN de la presente descripción es la

20 suma de las cargas eléctricas presentes en el al menos un lípido catiónico y las cargas eléctricas presentes en el ARN. La relación de carga es la relación de las cargas positivas presentes en el al menos un lípido catiónico a las cargas negativas presentes en el ARN. La relación de carga de las cargas positivas presentes en el al menos un lípido catiónico a las cargas negativas presentes en el ARN se calcula por la siguiente ecuación: relación de

25 carga=[(concentración de lípido catiónico (mol)) * (el número total de cargas positivas en el lípido catiónico)] / [(concentración de ARN (mol)) * (el número total de cargas negativas en ARN)].

Las partículas de lipoplex de ARN de direccionamiento al bazo descritas en la presente en el pH fisiológico tienen de manera preferente una carga negativa neta tal como una

30 relación de carga de cargas positivas a cargas negativas de alrededor de 1.9: 2 a alrededor de 1:2. En formas de realización específicas, la relación de carga de las cargas positivas a las cargas negativas en las partículas de lipoplex de ARN en el pH fisiológico es alrededor de 1.9:2.0, alrededor de 1.8:2.0, alrededor de 1.7:2.0, alrededor de 1.6:2.0, alrededor de 1.5:2.0, alrededor de 1.4:2.0, alrededor de 1.3:2.0, alrededor de 1.2:2.0, alrededor de 1.1:2.0, o

35 alrededor de 1:2.0.

Los sistemas de suministro de ARN tienen una preferencia inherente al hígado. Esto se refiere a partículas basadas en lípidos, nanopartículas catiónicas y neutras, en particular

nanopartículas lipídicas tal como liposomas, nanomicelas y ligandos lipofílicos en bioconjugados. La acumulación del hígado es provocada por la naturaleza discontinua de la vasculatura hepática o el metabolismo lipídico (liposomas y conjugados de lípido o colesterol).

En una forma de realización del suministro objetivo de un polipéptido variante de IL2 descrito en la presente, el órgano objetivo es el hígado y el tejido objetivo es el tejido del hígado. El suministro a este tejido objetivo es preferido, en particular, si la presencia del polipéptido variante de IL2 en este órgano o tejido se desea y/o si se desea expresar grandes cantidades del polipéptido variante de IL2 y/o si la presencia sistémica del polipéptido variante de IL2, en particular en cantidades significativas, se desea o se requiere.

En una forma de realización, el ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 se administra en una formulación para dirigirse al hígado. Estas formulaciones se describen en la presente en lo anterior.

Para la administración *in vivo* del ARN al hígado, se puede utilizar un sistema de suministro de fármaco para transportar el ARN en el hígado al prevenir su degradación. Por ejemplo, las nanomicelas de poliplex que consisten de una superficie recubierta con poli(etilenglicol) (PEG) y un núcleo que contiene ARNm es un sistema útil debido a que las nanomicelas proporcionan excelente estabilidad *in vivo* del ARN, bajo condiciones fisiológicas. Además, la propiedad de sigilo proporcionada por la superficie de nanomicela del poliplex, compuesta de empalizadas de PEG densas, evade de manera eficaz las defensas inmunitarias a hospederas.

Los péptidos, proteínas, polipéptidos, ARN, partículas de ARN, células efectoras inmunitarias y agentes adicionales, por ejemplo, inhibidores de puntos de control inmunitarios, descritos en la presente se pueden administrar en composiciones o medicamentos farmacéuticos para tratamientos terapéuticos o profilácticos y se pueden administrar en la forma de cualquier composición farmacéutica adecuada que pueda comprender un portador farmacéuticamente aceptable y puede comprender opcionalmente uno o más adyuvantes, estabilizadores, etcétera. En una forma de realización, la composición farmacéutica es para tratamientos terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, para el uso en tratar o prevenir una enfermedad que implica un antígeno tal como una enfermedad cancerosa tal como aquellas descritas en la presente.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una formulación que comprende un agente terapéuticamente eficaz, de manera preferente junto con portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir, o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno por la administración de la composición farmacéutica a un sujeto. Una composición farmacéutica también es conocida en la técnica como una formulación farmacéutica. En el contexto de la presente descripción, la composición farmacéutica comprende péptidos, proteínas, polipéptidos, ARN, partículas de

ARN, células efectoras inmunitarias y/o agentes adicionales como se describe en la presente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender uno o más adyuvantes o se pueden administrar con uno o más adyuvantes. El término “adyuvante” se refiere a un compuesto que prolonga, mejora o acelera una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos tal como emulsiones de aceite (por ejemplo, adyuvantes de Freund), compuestos minerales (tal como alumbre), productos bacterianos (tal como toxina de Bordetella pertussis), o complejos inmunoestimuladores. Ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, LPS, GP96, oligodesoxinucleótidos CpG, factores de crecimiento, y citoquinas, tal como monocinas, linfocinas, interleucinas, quimiocinas. Las citoquinas pueden ser IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL12, IFN α , IFN γ , GM-CSF, LT- α . Los adyuvantes conocidos adicionales son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceite tal como Montanide^{MR} ISA51. Otros adyuvantes adecuados para el uso en la presente descripción incluyen lipopéptidos, tal como Pam3Cys.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción se aplican en general en una “cantidad farmacéuticamente eficaz” y en “una preparación farmacéuticamente aceptable”.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

El término “cantidad farmacéuticamente eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular, la reacción deseada se refiere de manera preferente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende desacelerar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad también puede ser retrasada del inicio o una prevención del inicio de la enfermedad o afección. Una cantidad eficaz de las composiciones descritas en la presente dependerá de la afección que se trata, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluido edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia adjunta (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de las composiciones descritas en la presente pueden depender de varios de estos parámetros. En caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden utilizar dosis más altas (o dosis de manera eficaz más altas logradas por una vía de administración diferente, más localizada).

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden contener sales, soluciones amortiguadoras, conservadores y opcionalmente otros agentes terapéuticos. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los conservadores adecuados para el uso en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

El término “excipiente” como se utiliza en la presente se refiere a una sustancia que puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente descripción pero no es un ingrediente activo. Ejemplos de excipientes, incluyen sin limitación, portadores, aglutinantes, diluyentes, lubricantes, espesantes, agentes activo de superficie, conservadores, estabilizadores, emulsionantes, soluciones amortiguadoras, agentes saborizantes, o colorantes.

El término “diluyente” se refiere a un agente de dilución y/o adelgazamiento. Por otra parte, el término “diluyente” incluye cualquiera de uno o más de suspensión fluida, líquida o sólida y/o medios de mezclado. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

El término “portador” se refiere a un componente que puede ser natural, sintético, orgánico, inorgánico en el cual el componente activo se combina a fin de facilitar, mejorar o permitir la administración de la composición farmacéutica. Un portador como se utiliza en la presente puede ser uno o más rellenos sólido o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes, que son adecuados para la administración al sujeto. El portador adecuado incluye, sin limitación, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, solución salina isotónica, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lacturo biocompatibles, copolímeros de lacturo/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxi-propileno. En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente descripción incluye solución salina isotónica.

Los portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Los portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticos se pueden seleccionar con respecto a la vía de administración propuesta y práctica farmacéutica estándar.

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden administrar intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscularmente. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se formula para administración local o administración sistémica. La administración sistémica puede incluir administración enteral, que implica la absorción a través del tracto gastrointestinal, o administración parenteral. Como se utiliza en la presente, “administración parenteral” se refiere a la administración en cualquier manera diferente a través del tracto gastrointestinal, tal como por inyección intravenosa. En una forma de realización preferida, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración sistémica. En otra forma de realización

preferida, la administración sistémica es por administración intravenosa. En una forma de realización de todos los aspectos de la invención, el ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 descrito en la presente y opcionalmente ARN que codifica un antígeno se administra sistémicamente.

5 El término “co-administrar” como se utiliza en la presente significa un proceso mediante el cual diferentes compuestos o composiciones (por ejemplo, ARN que codifica un polipéptido variante de IL2, ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo y opcionalmente un inhibidor de punto de control inmunitario) se administran al mismo paciente. El ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 y el ARN que codifica un péptido
10 o proteína que comprende un epítipo se puede administrar simultáneamente, esencialmente al mismo tiempo, o secuencialmente. Si la administración se lleva a cabo secuencialmente, el ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 se puede administrar antes o después de la administración del ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo. Si la administración se lleva a cabo simultáneamente el ARN que codifica un polipéptido variante de
15 IL2 y el ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo no necesita ser administrado dentro de la misma composición. El ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 y el ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo se puede administrar una o más veces y el número de administraciones de cada componente puede ser el mismo o diferente. Además, el ARN que codifica un polipéptido variante de IL2 y el ARN
20 que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo no necesitan ser administrado al mismo tiempo.

Los polipéptidos variantes de IL2, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos variantes de IL2, las células hospederas que comprenden el polinucleótido que codifica los polipéptidos variantes de IL2, las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento
25 descritos en la presente se pueden utilizar en el tratamiento terapéutico o profiláctico de varias enfermedades, en particular enfermedades en las cuales la provisión de IL2, específicamente de los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente, un sujeto da por resultado un efecto terapéutico o profiláctico, tal como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, adyuvantes de vacuna en la vacuna contra el cáncer y terapia de
30 vacunas convencionales, para estimulación inmunitaria en personas de edad avanzada u otros individuos inmunocomprometidos, así como en pacientes con VIH o SCID humano, u otra aplicación terapéutica que requiera estimulación general del sistema inmunitario en cualquier animal adecuado, de manera preferente un mamífero, de manera mucho más preferente humano. La IL2 tiene muchos efectos. Algunos de éstos son estimulación de
35 células T, en particular células T de memoria, células T sin tratamiento previo y/o células T efectoras, y/o células NK. Los polipéptidos variantes de IL2 descritos en la presente tendrán actividades en los tipos de células que expresan solo el receptor de IL2 de afinidad intermedia,

tal como células T de memoria, células T sin tratamiento previo y/o células T efectoras, pero no en el receptor de IL2 de alta afinidad, tal como células T reguladoras. Por consiguiente, se contempla el uso de los polipéptidos variantes de IL2, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos variantes de IL2, las células hospederas que comprenden el polinucleótido que
5 codifica el polipéptido variante de IL2, las composiciones farmacéuticas y los métodos del tratamiento descritos en la presente en el tratamiento de aquellas enfermedades en las cuales que el IL2 se espera que proporcione una terapia eficaz debido a su actividad de células T.

Alternativamente, o además de los métodos de administración directa a los pacientes, en algunas formas de realización, los polipéptidos variantes de IL2 se pueden utilizar en
10 métodos *ex vivo*. Por ejemplo, las células (por ejemplo, linfocitos de sangre periférica o poblaciones purificadas de linfocitos aislados de un paciente y colocados o mantenidos en el cultivo) se pueden cultivar *in vitro* en el medio de cultivo y el paso de contacto se puede llevar a cabo al agregar los polipéptidos variantes de IL2, y/o los polinucleótidos que los codifican al medio de cultivo. El paso de cultivo puede incluir pasos adicionales en los cuales las células
15 se estimulan o se tratan con otros agentes, por ejemplo, para estimular la proliferación, o expandir una población de células que es reactiva a un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno canceroso o un antígeno viral). Las células luego se administran al paciente después de que se han tratado.

El término “enfermedad” se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad se considera frecuentemente como una afección médica asociada
20 con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede ser provocada por factores originalmente de una fuente externa, tal como enfermedad infecciosa, o puede ser provocada por disfunciones internas, tal como enfermedades autoinmunes. En humanos, “enfermedad” se utiliza frecuentemente más ampliamente para referirse a cualquier afección que provoque
25 dolor, disfunción, dolor, problemas sociales, o muerte al individuo afectado, o problemas similares para aquellos en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, algunas veces incluye lesiones, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, comportamientos desviados, y variaciones atípicas de estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros propósitos éstos se pueden considerar categorías distinguibles.
30 Las enfermedades afectan usualmente individuos no solo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de la vida y la personalidad de uno.

En el presente contexto, el término “tratar”, “que trata” o “intervención terapéutica” se refiere a la gestión y cuidado de un sujeto para el propósito de combatir una afección tal como
35 una enfermedad o trastorno. El término se propone incluir el espectro completo de tratamientos para una afección dada de la cual el sujeto está padeciendo, tal como la administración del compuesto terapéuticamente eficaz para aliviar los síntomas o

complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o mejorar los síntomas y complicaciones y/o para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección así como para prevenir la afección, en donde la prevención se va a entender como la gestión y cuidado de un individuo para el propósito de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones.

El término “tratamiento terapéutico” se refiere a cualquier tratamiento que mejore el estado de salud y/o prolongue la vida útil (incremente) de un individuo. El tratamiento puede eliminar la enfermedad de un individuo, detener o desacelerar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o desacelerar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un individuo, y/o disminuir la recurrencia en un individuo quien tiene actualmente o quien ha tenido previamente una enfermedad.

Los términos “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo” se refieren a cualquier tratamiento que se proponga prevenir una enfermedad que se presenta en un individuo. Los términos “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo” se utilizan en la presente intercambiabilmente.

Los términos “individuo” y “sujeto” se utilizan en la presente intercambiabilmente. Se refieren a un humano u otro mamífero (por ejemplo ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, oveja, cerdo, caballo o primate) que pueden estar afectados con o son susceptibles a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), pero pueden o no tener la enfermedad o trastorno. En muchas formas de realización, el individuo es un ser humano. A menos que se establezca de otra manera, los términos “individuo” y “sujeto” no indican una edad particular, y de esta manera abarca adultos, personas de edad avanzada, niños y recién nacidos. En formas de realización de la presente descripción, el “individuo” o “sujeto” es un “paciente”.

El término “paciente” significa un individuo o sujeto para tratamiento, en particular un individuo o sujeto enfermo.

En una forma de realización de la descripción, el objetivo es proporcionar una respuesta inmunitaria contra células enfermas que expresan un antígeno tal como células cancerosas que expresan un antígeno tumoral, y para tratar una enfermedad tal como una enfermedad cancerosa que implica células que expresan un antígeno tal como un antígeno tumoral.

Una composición farmacéutica que comprende ARN que codifica un péptido o proteína que comprende un epítipo se puede administrar a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno que comprende el epítipo en el sujeto que puede ser terapéutico o parcialmente o totalmente protector. Una persona experta en la técnica sabrá que otros de los principios de la inmunoterapia y vacunación se basan en el hecho de que una

reacción inmunoprotectora a una enfermedad se produce al inmunizar un sujeto con un antígeno o un epítipo, que es inmunológicamente relevante con respecto a la enfermedad que se trata. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente son aplicables para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria. Las composiciones farmacéuticas
 5 descritas en la presente de esta manera son útiles en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica un antígeno o epítipo.

Como se utiliza en la presente, “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta corporal integrada a un antígeno o una célula que expresa un antígeno y se refiere a una respuesta inmunitaria celular y/o una respuesta inmunitaria humoral. Una respuesta
 10 inmunitaria celular incluye, sin limitación, una respuesta celular dirigida a las células que expresan un antígeno y se caracteriza por la presentación de un antígeno con una molécula MHC clase I o clase II. La respuesta celular se refiere a linfocitos T, que se pueden clasificar como células T auxiliares (también llamadas células T CD4⁺) que desempeñan una función central al regular la respuesta inmunitaria o células exterminadoras (también llamadas células
 15 T citotóxicas, células T CD8⁺, o CTLs) que inducen apoptosis en las células infectadas o células cancerosas. En una forma de realización, la administración en una composición farmacéutica de la presente descripción implica la estimulación de una respuesta de células T CD8⁺ antitumorales contra células cancerosas que expresan uno o más antígenos tumorales. En una forma de realización específica, los antígenos tumorales se presentan con la molécula
 20 MHC clase I.

“Inmunidad mediada por célula”, “inmunidad celular”, “respuesta inmunitaria celular”, o términos similares se proponen incluir una respuesta celular dirigida a las células caracterizadas por la expresión de un antígeno, en particular caracterizada por la presentación de un antígeno con MHC clase I o clase II. La respuesta celular se refiere a células llamadas
 25 células T o linfocitos T que actúan como ya sea “auxiliares” o “exterminadores”. Las células T auxiliares (también llamadas células T CD4⁺) desempeñan una función central al regular la respuesta inmunitaria y las células exterminadoras (también llamadas células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8⁺ o CTLs) que exterminan células enfermas tal como células cancerosas, previniendo la producción de más células enfermas.

La presente descripción contempla una respuesta inmunitaria que puede ser protectora, preventiva, profiláctica y/o terapéutica. Como se utiliza en la presente, “induce [o que induce] una respuesta inmunitaria” puede indicar que ninguna respuesta inmunitaria contra un antígeno particular estuvo presente antes de la inducción o puede indicar que hubo un nivel basal de respuesta inmunitaria contra un antígeno particular antes de la inducción,
 30 que se mejoró después de la inducción. Por tanto, “induce [o que induce] una respuesta inmunitaria” incluye “potencia [o que mejor a] una respuesta inmunitaria”.

El término “inmunoterapia” se refiere al tratamiento de una enfermedad o afección al

inducir o al mejorar una respuesta inmunitaria. El término “inmunoterapia” incluye la inmunización con antígenos o la vacunación con antígenos.

Los términos “inmunización” o “vacunación” describen el proceso de administrar un antígeno a un individuo con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria, por ejemplo, por razones terapéuticas o profilácticas.

Los péptidos, proteínas, polipéptidos, ARN, partículas de ARN y agentes adicionales, por ejemplo, inhibidores de punto de control inmunitarios, descritos en la presente se pueden utilizar en el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades en las que la provisión de un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una La respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto al sujeto da por resultado un efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, la provisión de un antígeno o epítipo que se deriva de un virus puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad viral provocada por el virus. La provisión de un antígeno o epítipo tumoral puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad cancerosa en donde las células cancerosas expresan dicho antígeno tumoral.

En una forma de realización, la presente descripción prevé formas de realización en donde se administran formulaciones de ARN tal como partículas lipoplexos de ARN como se describe en la presente que se dirigen al tejido del bazo. El ARN codifica, por ejemplo, un péptido o proteína que comprende un epítipo como se describe, por ejemplo, en la presente. El ARN es captado por las células que presentan antígeno del bazo tal como células dendríticas para expresar el péptido o proteína. Después del procesamiento y presentación opcional por las células que presentan antígeno, se puede generar una respuesta inmunitaria contra el epítipo, que da por resultado un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica el epítipo o un antígeno que comprende el epítipo. En una forma de realización, la respuesta inmunitaria inducida por el ARN descrito en la presente comprende la presentación de un antígeno o fragmento del mismo, tal como un epítipo, por células que presentan antígeno, tal como células dendríticas y/o macrófagos, y la activación de células T citotóxicas debido a esta presentación. Por ejemplo, los péptidos o proteínas codificados por los ARN o productos de procesamiento de los mismos se pueden presentar por proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresados en las células que presentan antígeno. El complejo de péptidos MHC luego puede ser reconocido por las células inmunitarias, tal como células T o células B, que conducen a su activación.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere al ARN como se describe en la presente para su uso en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica un antígeno, de manera preferente una enfermedad cancerosa.

El término “macrófago” se refiere a un subgrupo de células fagocíticas producidas por la diferenciación de monocitos. Los macrófagos que se activan por inflamación, citocinas inmunitarias o productos microbianos no específicamente envuelven y exterminan patógenos

extraños dentro del macrófago por ataque hidrolítico y oxidativo que da por resultado la degradación del patógeno. Los péptidos de las proteínas degradadas se muestran en la superficie celular de macrófagos, en donde se pueden reconocer por las células T, y pueden interactuar directamente con los anticuerpos en la superficie de las células B, dando por resultado activación de las células T y B y estimulación adicional de la respuesta inmunitaria. Los macrófagos pertenecen a la clase de células que presentan antígenos. En una forma de realización, los macrófagos son macrófagos esplénicos.

El término “célula dendrítica” (DC) se refiere a otro subtipo de células fagocíticas que pertenecen a la clase de células que presentan antígeno. En una forma de realización, las células dendríticas se derivan de células progenitoras de médula ósea hematopoyéticas. Estas células progenitoras se transforman inicialmente en células dendríticas inmaduras. Estas células inmaduras se caracterizan por una alta actividad fagocítica y un bajo potencial de activación de células T. Las células dendríticas inmaduras muestrean constantemente el entorno circundante para patógenos tal como virus y bacterias. Una vez que han entrado en contacto con un antígeno presentable, se activan en las células dendríticas maduras y comienzan a migrar al bazo o al ganglio linfático. Las células dendríticas inmaduras fagocitosan los patógenos y degradan sus proteínas en pequeñas piezas y tras la maduración presentan aquellos fragmentos en su superficie celular utilizando moléculas MHC. Simultáneamente, regulan por incremento los resultados de superficie celular que actúan como correceptores en la activación de las células T, tal como CD80, CD86 y CD40, que mejora en gran medida su capacidad de activar células T. También regulan por incremento CCR7, un receptor quimiotáctico que induce a la célula dendrítica a viajar a través del torrente sanguíneo al bazo o a través del sistema linfático a un ganglio linfático. En este punto, actúan como células que presentan antígeno y activan las células T auxiliares y células T exterminadoras, así como células B al presentar los antígenos, junto con las señales co-estimuladoras específicas no de antígeno. De esta manera, las células dendríticas pueden inducir activamente una respuesta inmunitaria relacionada con células T o B. En una forma de realización, las células dendríticas son células dendríticas esplénicas.

El término “célula que presenta antígeno” (APC) es una célula de una variedad de células capaces de mostrar, adquirir, y/o presentar al menos un antígeno o fragmento antigénico sobre (o en) su superficie celular. Las células que presentan antígeno se pueden distinguir en células que presentan antígeno profesionales y células que presentan antígeno no profesionales.

El término “células que presentan antígeno profesionales” se refiere a las células que presentan antígeno que expresan constitutivamente en las moléculas de Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC clase II) requeridas para la interacción con las células T sin tratamiento previo. Si una célula T interactúa con el complejo de la molécula MHC clase II en

la membrana de la célula que presenta antígeno, la célula que presenta antígeno produce una molécula co-estimuladora que induce la activación de la célula T. Las células que presentan antígeno profesionales comprenden células dendríticas y macrófagos.

El término “células que presentan antígeno no profesionales” se relaciona con las células que presentan antígeno que no expresan constitutivamente las moléculas MHC clase II, pero tras la estimulación por ciertas citocinas tal como interferón-gamma. Las células que presentan antígenos no profesionales ejemplares incluyen fibroblastos, células epiteliales tímicas, células epiteliales de la tiroides, células gliales, células beta pancreáticas o células endoteliales vasculares.

“Procesamiento de antígenos” se refiere a la degradación de un antígeno en productos de procesamiento, que son fragmentos del antígeno (por ejemplo, la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, a través de la unión) con moléculas de MHC para la presentación por las células, tal como células que presentan antígeno a las células T específicas.

El término “enfermedad que implica un antígeno” o “enfermedad que implica un epítipo” se refiere a cualquier enfermedad que implica un antígeno o epítipo, por ejemplo, una enfermedad que es caracterizada por la presencia de un antígeno o epítipo. La enfermedad que implica un antígeno o epítipo puede ser una enfermedad infecciosa o una enfermedad cancerosa o simplemente cáncer. Como se menciona en lo anterior, el antígeno puede ser un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno asociado tumoral, un antígeno viral o un antígeno bacteriano y el epítipo se puede derivar de este antígeno. En una forma de realización, una enfermedad que implica un antígeno es una enfermedad que implica células que expresan un antígeno, de manera preferente sobre la superficie celular.

El término “enfermedad infecciosa” se refiere a cualquier enfermedad que se puede transmitir de individuo a individuo o de organismo a organismo, y es provocada por un agente microbiano (por ejemplo resfriado común). Las enfermedades infecciosas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, o una enfermedad parasítica, cuyas enfermedades son provocadas por un virus, una bacteria, y un parásito, respectivamente. En este aspecto, la enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, hepatitis, enfermedades sexualmente transmitidas (por ejemplo clamidia o gonorrea), tuberculosis, VIH/síndrome de deficiencia inmunitaria adquirida (SIDA), difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera, síndrome respiratorio agudo y grave (SARS), la gripa aviar, e influenza.

Los términos “enfermedad cancerosa” o “cáncer” se refieren a o describen la afección fisiológica en un individuo que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. De manera más particular, los ejemplos de estos cánceres incluyen cáncer óseo, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer

pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, carcinoma de los órganos sexuales y reproductores, Enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de
 5 intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroides, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma de la pituitaria. El término “cáncer” de acuerdo con la
 10 descripción también comprende metástasis cancerosas.

Las estrategias de combinación en el tratamiento contra el cáncer pueden ser deseables debido a un efecto sinérgico resultante, que puede ser considerablemente más fuerte que el impacto de un procedimiento monoterapéutico. En una forma de realización, la composición farmacéutica se administra con un agente inmunoterapéutico. Como se utiliza en
 15 la presente, “agente inmunoterapéutico” se refiere a cualquier agente que pueda implicar en activar una respuesta inmunitaria específica y/o una función(es) efectora inmunitaria. Ejemplos de agentes inmunoterapéuticos incluyen vacunas tal como vacunas de células T, células efectoras inmunitarias o una combinación de las mismas. La presente descripción también contempla el uso de un anticuerpo como agente inmunoterapéutico. Sin que se desee ser
 20 limitado por una teoría, los anticuerpos son capaces de lograr un efecto terapéutico contra células cancerosas a través de varios mecanismos, que incluyen inducir la apoptosis, componentes de bloque de rutas de transducción de señal o inhibir la proliferación de células tumorales. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal puede inducir la muerte celular a través de citotoxicidad mediada por
 25 células dependiente de anticuerpos (ADCC) o proteínas del complemento de unión, que conducen a una toxicidad celular directa, conocido como citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-cáncer y objetivos de anticuerpos potenciales (entre corchetes) que se pueden utilizar en combinación con la presente divulgación incluyen: Abagovomab (CA-125), Abciximab (CD41), Adecatumumab
 30 (EpCAM), Afutuzumab (CD20), Alacizumab pegol (VEGFR2), Altumomab pentetato (CEA), Amatuximab (MORAb-009), Anatumomab mafenatox (TAG-72), Apolizumab (HLA-DR), Arcitumomab (CEA), Atezolizumab (PD-L1), Bavituximab (fosfatidilserina), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44 v6), Blinatumomab (CD 19), Brentuximab vedotina (CD30 TNFRSF8), Cantuzumab mertansina
 35 (mucina CanAg), Cantuzumab ravidansina (MUC1), Capromab pendetide (células de carcinoma prostático), Carlumab (CNT0888), Catumaxomab (EpCAM, CD3), Cetuximab (EGFR), Citatuzumab bogatox (EpCAM), Cixutumumab (receptor de IGF-1), Claudiximab (Claudin),

Clivatuzumab tetraxetan (MUC1), Conatumumab (TRAIL-R2), Dacetuzumab (CD40),
 Dalotuzumab (receptor de factor de crecimiento similar a insulina I), Denosumab (RANKL),
 Detumomab (célula del linfoma B), Drozitumab (DR5), Ecomeximab (gangliósido GD3),
 Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Enavatuzumab (PDL192), Ensituximab (NPC-
 5 1C), Epratuzumab (CD22), Ertumaxomab (HER2/neu, CD3), Etaracizumab (integrina $\alpha\beta3$),
 arletuzumab (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlaturuzumab (SCH 900105),
 Figitumumab (receptor de IGF-1), Flanvotumab (glicoproteína 75), Fresolimumab (TGF- β),
 Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicina (CD33), Gevokizumab
 (IL1 β), Girentuximab (anhidrasa carbónica 9 (CA-IX)), Glembatumumab vedotina (GPNMB),
 10 Ibritumomab tiuxetano (CD20), Icrucumab (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuximab
 raptansina (SDC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogamicina (CD22), Ipilimumab (CD
 152), Iratumumab (CD30), Labetuzumab (CEA), Lexatumumab (TRAIL-R2), Libivirumab
 (antígeno de superficie de hepatitis B), Lintuzumab (CD33), Lorvotuzumab mertansina (CD56),
 Lucatumumab (CD40), Lumiliximab (CD23), Mapatumumab (TRAIL-R1), Matuzumab (EGFR),
 15 Mepolizumab (IL5), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (GD3 ganglioside), Mogamulizumab
 (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (antígeno C242),
 Naptumomab estafenatox (5T4), Namatumab (RON), Necitumumab (EGFR), Nimotuzumab
 (EGFR), Nivolumab (IgG4), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGF-R a), Onartuzumab
 (receptor de factor de dispersión humana cinasa), Oportuzumab monatox (EpCAM),
 20 Oregovomab (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3),
 Pentumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomab (antígeno adenocarcinoma),
 Pritumumab (vimentina), Racotumomab (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab (dominio
 extra de fibronectina B), Rafivirumab (glicoproteína del virus de la rabia), Ramucirumab
 (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor IGF-1),
 25 Samalizumab (CD200), Sibrotuzumab (FAP), Siltuximab (IL6), Tabalumab (BAFF),
 Tacatuzumab tetraxetano (alfa-fetoproteína), Taplitumomab paptox (CD 19), Tenatumomab
 (tenascina C), Teprotumumab (CD221), Ticilimumab (CTLA- 4), Tigatuzumab (TRAIL-R2),
 TNX-650 (IL13), Tositumomab (CD20), Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2),
 Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleucina (EpCAM), Ublituximab (MS4A1),
 30 Urelumab (4-1 BB), Volociximab (integrina $\alpha5\beta1$), Votumumab (antígeno tumoral CTAA 16.88),
 Zalutumumab (EGFR), y Zanolimumab (CD4).

La cita de los documentos y estudios referidos en la presente no se proponen como
 una admisión que cualquiera de lo anterior se refiere a la técnica anterior. Todas las
 declaraciones en cuanto al os contenidos de estos documentos se basan en la información
 35 disponible a los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a las correcciones
 de los contenidos de estos documentos.

La siguiente descripción se presenta para permitir que una persona de experiencia

ordinaria en la técnica haga y use las diversas formas de realización. La descripción de los dispositivos específicos, técnicas y aplicaciones se proporcionan solo como ejemplos. Varias modificaciones a los ejemplos descritos en la presente serán fácilmente evidentes para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica, y los principios generales definidos en la presente se pueden aplicar a otros ejemplos y aplicaciones sin apartarse del espíritu y alcance de las diversas formas de realización. De esta manera, las diversas formas de realización no se proponen ser limitadas a los ejemplos descritos en la presente pero van a estar de acuerdo con el alcance consistente con las reivindicaciones.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1: Diseño del constructo y producción de ARNm

A fin de diseñar variantes de IL2 humana (hIL2) que combinan la unión disminuida a y activación de hIL2R α (CD25) con unión incrementada y activación de hIL2R β (CD122) se introdujeron varias mutaciones en el sitio de unión hIL2R β de la muteína hIL2 A4, que se describe con el enlace CD25. Reducido. Además de las sustituciones de aminoácidos K43E y E61K, que son las que definen las mutaciones de la muteína hIL2 A4, se introdujeron las siguientes mutaciones adicionales en dominio maduro de hIL2:

- hIL2_A4s: L80F, R81D, L85V, I86V, I92F
- hIL2_A4s1: L80F, R81E, L85V, I86V, I92F
- hIL2_A4s2: L80F, R81E, L85V, I86V, I92W
- hIL2_A4s3: L80F, R81E, I92F
- hIL2_A4s4: L80F, R81D, I92F
- hIL2_A4s6: Q74H, L80F, R81E, I92F
- hIL2_A4s7: Q74H, L80F, R81E, I92W
- hIL2_A4s8: Q74H, L80F, R81E, L85V, I92F

Los ARNm que codifican citoquinas para la transcripción *in vitro* se basaron en la cadena principal del plásmido pST1-T7-AGA-dEarl-hAg-MCS-FI-A30LA70 y los constructos de ADN derivados. Estos constructos de plásmido que contienen una 5' UTR (región no traducida, un derivado de la 5'-UTR de la subunidad alfa 1 de hemoglobulina de *homo sapiens* (hAg)), un elemento 3' FI (donde F es un fragmento de 3'-UTR de 136 nucleótidos de largo del mejorador amino-terminal del ARNm dividido e I es un fragmento largo de 142 nucleótidos de 12S ARN mitocondrialmente codificado ambos identificados en *Homo sapiens*; WO 2017/060314) y una cola poli(A) de 100 nucleótidos, con un ligador después de 70 nucleótidos. La citoquina y las secuencias de codificación de albúmina en suero (hAlb) se originan del *Homo sapiens* y no se introdujeron cambios en las secuencias de aminoácidos resultantes excepto para las mutaciones propuestas en las variantes de hIL2 descritas en lo anterior (hIL2: NP_000577.2; NCBI protein resource; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Para los constructos de citoquinas la variante de hIL2 se agregó a la C-terminal de hAlb y las

proteínas codificadas se equiparon con un péptido señal N-terminal (SP) que es el SP nativo de la proteína respectiva. En casos de proteínas de fusión, solo el SP de la porción N-terminal se mantiene, para formas de realización adicionales solo la porción madura (proteína sin SP) se codificó. Un codón de detención se introdujo en la porción más C-terminal solamente.

- 5 Diferentes porciones de proteínas en la citoquina y los constructos de fusión de hAlb se separaron por una secuencia ligadora de 30 nucleótidos de largo que codifica para residuos de glicina y serina.

El ARNm se generó por transcripción *in vitro* como se describe por Kreiter y colaboradores (Kreiter, S. y colaboradores *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1577–87 (2007)) con la sustitución del nucleósido normal uridina por 1-methyl-pseudouridina. Los ARNms resultantes se equiparon con una estructura Cap1 y se agotan las moléculas de doble hebra (ARNds). El ARNm purificado se eluyó en H₂O y se almacenó a -80°C hasta uso futuro. La transcripción *in vitro* de todos los constructos de ARNm descritos se llevó a cabo en BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH. Una lista de todos los constructos utilizados en los experimentos subsecuentes se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de proteínas codificadas y expresadas por ARNm

20	hAlb	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAA 25 DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
30	hAlb-hIL2	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVA 35 RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDV

5		CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
10	hAlb-hIL2_A4	MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRRDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNP NLPR LVRPEV DVMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECC QAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVA 15 RLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC 20 VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET 25 ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
30	hAlb-hIL2_A4s	MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRRDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNP NLPR LVRPEV DVMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECC QAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTK 35 KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH

5

10

15

20

25

30

35

	ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAQSKNFHFDPRDVVSINNVFVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A4s1	MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAQSKNFHFEPRDVVSINNVFVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A4s2	MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAQSKNFHFEPRDVVSINNVVLELKGSETTFMCEYADE

		TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
5	hAlb- hIL2_A4s3	MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAA 10 DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ 15 LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FEFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAQSKNFHFEP RDLISNINVFVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
20	hAlb- hIL2_A4s4	MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAA 25 DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ 30 LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FEFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAQSKNFHFDP RDLISNINVFVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
35	hAlb- hIL2_A4s6	MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEV

5

10

15

20

25

30

35

	DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFFFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAHASKNFHFEPRLISNINVFVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A4s7	MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRRDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NL PRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFFFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAHASKNFHFEPRLISNINWVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A4s8	MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRRDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHTLFGDK LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NL PRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVA RLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV

5

10

	CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAA DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTK KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQ LQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFFYMPKKATELKHLQCLEK ELKPLEEVLNLAHSKNFHFEPDVISNINVFVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
--	--

15

20

25

30

35

Ejemplo 2: Actividad funcional de las variantes hAlb-hIL2_A4 novedosas como mutaciones en la región de unión de hIL2R β (CD122) en comparación con la hAlb-hIL2_A4 parenteral en diferentes subconjuntos de células en las PBMCs humanas y esplenocitos de ratón medidos por fosforilación mediada por IL2 de STAT5.

Para evaluar la actividad funcional de las variantes de hAlb-hIL2_A4 novedosas mutadas adicionalmente en la región de unión de hIL2R β (CD122) en comparación con hAlb-hIL2_A4 mutadas solamente en la región de unión hIL2R α (CD25), diferentes subconjuntos de células T CD25⁺ y CD25⁻ así como células NK en PBMCs humanas a granel (FIGURAS 1A-1C) o esplenocitos de ratón (FIGURAS 2A-2C) se estimularon con sobrenadantes que contienen citoquinas y se sometieron a ensayo para fosforilación de STAT5. A fin de generar sobrenadantes que contienen citoquinas, 1.2×10^6 células HEK293T/17 se sembraron en 3 mL de DMEM (Life Technologies GmbH, cat. no. 31966-021) + 10% de suero bovino fetal (FBS, Biochrom GmbH, cat. no. S0115) en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C, durante la noche en CO₂ al 5%. Al siguiente día 3 μ g de ARNm que codifica citoquinas se formularon bajo condiciones estériles y sin RNasa utilizando 400 ng de ARNm por μ L de Lipofectamina MessengerMax (Thermo Fisher Scientific, cat. No. LMRNA015) y se aplicaron por 10 cm² en la caja de cultivo a las células HEK293T/17 en alrededor de 80% de confluencia. Después de 20 h de la expresión, los sobrenadantes se recolectaron bajo condiciones estériles y se almacenaron a -20°C hasta uso adicional. Las PBMCs se obtuvieron de capas leucocitarias de donadores sanos por la separación de gradiente de densidad Ficoll-Paque (1.073 g/mL, VWR international, cat. no. 17-1440-03). Las PBMCs se lavaron dos veces con D-PBS (Life Technologies GmbH, cat. no. 14190250) y se recolectaron por centrifugación durante 8 min, 300 $\times$ g a temperatura ambiente. Para el aislamiento de los esplenocitos de ratón, un ratón Balb/c (Balb/c JRj, Janvier Labs) se sacrificó por dislocación cervical y el bazo se retiró de la cavidad peritoneal. El bazo se disoció mecánicamente a través de un colador de células 70- μ m y la suspensión celular resultante se lavó una vez en D-PBS antes de la separación de las

células por la centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque (1.084 g/mL, VWR International, cat. no. 17-5446-02). Los esplenocitos aislados se lacaron dos veces con D-PBS y se recolectaron por centrifugación durante 8 min, 300 ×g a temperatura ambiente. Para el ensayo de fosforilación de STAT5, las PBMCs se volvieron a suspender en el Medio de

5 Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Life Technologies GmbH, cat. no. 12440-053) complementado con 5% de suero humano derivado de plasma (PHS; One Lambda Inc., cat. no. A25761) y los esplenocitos se resuspendieron en RPMI 1640 (Life Technologies GmbH, cat. no. 61870010) complementados con 10% de FBS y ambos se pusieron a reposo durante 1 h a 37°C y CO₂ al 5%. Después, 125,000 PBMCs o esplenocitos se sembraron por pocillo de

10 una placa de fondo de V de 96 pasillos (Greiner Bio-One GmbH, cat. no. 651101) en el medio respectivo. En paralelo, seis diluciones en serie de cuatro veces de sobrenadantes que contienen citoquinas se generaron en el IMDM suplementado con 5% de PHS o RPMI 1640 complementado con 10% de FBS. Las células sembradas se mezclaron 1:1 (con referencia al volumen del medio de cultivo de las semillas sembradas) con sobrenadantes que contienen

15 citoquinas y se estimularon durante 10 min a 37°C y CO₂ al 5%. Después, 1:1000 de tinte de capacidad de fijación eFluor^{MR} 780 se agregó y las células se estimularon durante 5 min a 37°C y CO₂ al 5%. Las células se fijaron por la adición de formaldehído (Carl Roth GmbH + Co. KG, cat. no. P087.4) a 2% y se incubó durante 10 min sobre hielo. Las células fijas se lavaron con D-PBS helado y se permeabilizaron con 100% de metanol helado durante 30 min

20 sobre hielo. Las PBMCs permeabilizadas se lavaron dos veces con D-PBS complementado con 2% de FBS y EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich, cat. no. 03690-100ML) y se tiñeron subsecuentemente con 1:5 Alexa Fluor^{MR} 488 Anti-Stat5 (pY694) (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 612598), 1:25 PerCP-Cy^{MR}5.5 CD25 Anti-Humano de Ratón (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 560503), CD4 Anti-Humano de Ratón 1:50 BV421 (Becton Dickinson GmbH, cat. no.

25 565997), CD8 Anti-Humano de Ratón 1:25 BV510 (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 563256) y CD56 Anti-Humano de Ratón 1:12.5 APC (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 555518) en D-PBS complementado con 2% de FBS y EDTA 2 mM durante 30 min a 2-8°C protegidos de la luz. Los esplenocitos permeabilizados se lavaron dos veces con D-PBS complementado con 2% de FBS y EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich, cat. no. 03690-100ML) y se tiñeron

30 subsecuentemente con 1:5 Alexa Fluor^{MR} 488 Anti-Stat5 (pY694) (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 612598), CD25 Anti-Ratón de Rata 1:25 PerCP-Cy^{MR}5.5 (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 551071), CD4 Anti-Ratón de Rata 1:50 BV786 (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 563727), CD Anti-Ratón de Rata 1:25 BV605 (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 563152) y CD49b Anti-Ratón de Rata 1:25 BV421 (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 563063) en D-PBS

35 complementado con 2% de FBS y EDTA 2 mM durante 30 min a 2-8°C protegidos de la luz. Las PBMCs teñidas y esplenocitos se lavaron dos veces y finalmente se volvieron a suspender en D-PBS complementado con 2% de FBS y EDTA 2 mM. Se llevó a cabo el

análisis citométrico de flujo en un citómetro de flujo BD FACSCanto^{MR} II o FACSCelesta (Becton Dickinson GmbH) y los datos adquiridos se analizaron utilizando el software FlowJo versión 10. Las curvas de dosis-respuesta y los valores EC₅₀ se calcularon en GraphPad Prism versión 6.04 (GraphPad Software, Inc.).

5 En todos los subconjuntos de PBMC analizados, independiente de la especificación de CD25, todas las variantes de hAlb-hIL2_A4 novedosas diseñadas para la unión de CD122 incrementada excepto para hAlb-hIL2_A4s7 mostraron potencia superior sobre hAlb-hIL2_A4. Con detalle, la actividad biológica de hAlb-hIL2_A4s, hAlb-hIL2_A4s1 y hAlb-hIL2_A4s8 se incrementó en gran medida por al menos un paso de registro (CD4⁺CD25⁺ T_{reg}, EC₅₀ alrededor de 0.1% de sobrenadante) o hasta dos pasos log (células T CD8⁺, EC₅₀ 0.182% de sobrenadante) comparadas con hAlb-hIL2_A4 (EC₅₀ 1.247% de sobrenadante en T_{reg}, EC₅₀ >20% de sobrenadante en las células T CD8⁺) (FIGURA 1, Tabla 2). hAlb-hIL2_A4s, hAlb-hIL2_A4s1 y hAlb-hIL2_A4s8 llevadas a cabo en pares en las células CD4⁺CD25⁺ T_{reg} y se fueron similarmente eficaces en las células T CD8⁺ y las células NK CD56⁺. Además de hAlb-hIL2_A4s7, hAlb-hIL2_A4s2 mostró el último incremento en la actividad biológica, mientras que los otras variantes hAlb-hIL2_A4s3, hAlb-hIL2_A4s4 y hAlb-hIL2_A4s6 mostraron un fenotipo intermedio (FIGURAS 1A-1C). En los esplenocitos de ratón se obtuvieron resultados comparables con respecto al desempeño de las diversas variantes de hAlb-hIL2_A4 entre sí, sin embargo, los esplenocitos de ratón mostraron una sensibilidad reducida general hacia la fosforilación inducida por la variante de hAlb-hIL2_A4 de STAT5 de alrededor de 30 veces (FIGURAS 2A-2C).

Tabla 2: valores EC₅₀ [% de sobrenadante] calculados basados en la dosis-respuesta de la fosforilación de STAT5 para las variantes de hAlb-hIL2_A4 en diferentes subconjuntos de PBMC humanos.

25	Variante de hAlb-hIL2	Células CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg}	Células T CD8 ⁺	Células NK CD56 ⁺
	hAlb-hIL2_A4	1.247	> 20	> 50
	hAlb-hIL2_A4s	~ 0.1	0.182	0.829
	hAlb-hIL2_A4s1	~ 0.1	0.436	1.437
30	hAlb-hIL2_A4s2	0.851	6.881	> 20
	hAlb-hIL2_A4s3	~ 0.5	1.550	7.802
	hAlb-hIL2_A4s4	0.176	0.546	2.803
	hAlb-hIL2_A4s6	~ 0.2	1.118	6.125
	hAlb-hIL2_A4s7	3.904	> 50	n/a
35	hAlb-hIL2_A4s8	~ 0.1	0.298	1.282

Ejemplo 3: Bioactividad relativa de las variantes de hAlb-hIL2_A4 novedosas con mutaciones en la región de unión de hIL2R β (CD122) en las líneas de células informadoras dependientes de IL2 que expresan el receptor de IL2 de afinidad intermedia (IL2R $\beta\gamma$)- y receptor de IL2 de afinidad alta (IL2R $\alpha\beta\gamma$).

5 A fin de analizar si específicamente la cadena hIL2R α (CD25) influyen actividad biológica de las diferentes variantes de hAlb-hIL2_A4 novedosas, se determinaron las respuestas de proliferación de las células TF-1_hIL2R $\beta\gamma$ y TF-1_hIL2R $\alpha\beta\gamma$, derivadas de la línea de células eritroleucémica humana TF-1 (ATCC CRL-2003) que expresan naturalmente la cadena γ común de IL2R, (FIGURAS 3A-3B). Las líneas de células se generaron por transducción con el vector retroviral que codifica para la secuencia de la cadena IL2R β (Gene ID: 3560) y opcionalmente un segundo vector retroviral que codifica la secuencia de la cadena hIL2R α humana (Gene ID: 3559) análoga a Farner, N. L. y colaboradores Blood 86, 4568–4578 (1995). En resumen, las células TF-1_IL2R $\beta\gamma$ y TF-1_IL2R $\alpha\beta\gamma$ se recolectaron del cultivo continuo, se lavaron dos veces con D-PBS y se resuspendieron en RPMI 1640 complementado con 10% FBS y piruvato de sodio 1 mM (Life Technologies GmbH, cat. no. 11360070). Un total de 5,000 células/pocillo se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos blancas (Fisher Scientific GmbH, cat. no. 10072151) y se incubaron con ocho diluciones en serie de cuatro veces de sobrenadantes que contienen la variante de hAlb-hIL2_A4 (generados como se describe en el Ejemplo 2). Después de tres días de cultivos se midió la proliferación para cuantificar las células viables a través de la cantidad de ATP utilizando el Ensayo CellTiter-Glo+MR 2.0 (Promega, cat. no. G9242). Se registró la Luminiscencia en un lector de Tecan Infinite^{MR} F200 PRO (Tecan Deutschland GmbH) y las curvas de dosis-respuesta se graficaron así como los valores EC₅₀ calculados en GraphPad Prism versión 6.04 (GraphPad Software, Inc.).

25 En células TF-1_hIL2R $\beta\gamma$ que expresan IL2R $\beta\gamma$ independientes de CD25, hAlb-hIL2_A4s, hAlb-hIL2_A4s1 y hAlb-hIL2_A4s8 se llevaron a cabo en pares con curvas de respuesta de dosis casi superpuestas (FIGURA 3A). Esto también se refleja en los valores EC₅₀ calculados que varían de 0.712% de sobrenadante para hAlb-hIL2_A4s a 0.755% de sobrenadante para hAlb-hIL2_A4s1 y 0.807% de sobrenadante para hAlb-hIL2_A4s8 (Tabla 3). Las variantes hAlb-hIL2_A4s2 y hAlb-hIL2_A4s7 mostraron un cambio de más de 10 veces hacia la actividad biológica disminuida como es esperado a partir de los resultados en el Ejemplo 2. Las variantes restantes hAlb-hIL2_A4s3, hAlb-hIL2_A4s4 y hAlb-hIL2_A4s6 mostraron un fenotipo intermedio con valores EC₅₀ entre 1.270% de sobrenadante y 2.557% de sobrenadante (FIGURA 3A, Tabla 3). En contraste, en las células TF-1_hIL2R $\alpha\beta\gamma$ que expresan IL2R $\alpha\beta\gamma$ dependientes de CD25 las curvas de dosis-respuesta de todas las variantes de hAlb-hIL2 cambiaron ligeramente hacia la bioactividad incrementada y las diferencias entre las variantes individuales fueron menos pronunciadas (FIGURA 3B). Mientras

que hAlb-hIL2_A4s1 y hAlb-hIL2_A4s8 aún se identificaron como los de mejor desempeño con los valores EC₅₀ de 0.216% de sobrenadante y 0.236% de sobrenadante, respectivamente, todas las otras variantes excepto para hAlb-hIL2_A4s7 (EC₅₀ 2.689% de sobrenadante) mostraron valores EC₅₀ similar entre 0.314% de sobrenadante y 0.566% de sobrenadante (FIGURA 3B, Tabla 3).

Tabla 3: Valores EC₅₀ [% de sobrenadante] calculados basados en la dosis-respuesta de proliferación del cultivo de células TF-1_IL2Rβγ dependientes del receptor IL2 de afinidad intermedia (IL2Rβγ) y del cultivo de células TF-1_IL2Rαβγ dependientes del receptor IL2 de alta afinidad (IL2Rαβγ).

Variante de hAlb-hIL2	TF-1_IL2Rβγ	TF-1_IL2Rαβγ
hAlb-hIL2_A4s	0.712	0.314
hAlb-hIL2_A4s1	0.755	0.216
hAlb-hIL2_A4s2	7.646	0.566
hAlb-hIL2_A4s3	2.557	0.305
hAlb-hIL2_A4s4	1.270	0.254
hAlb-hIL2_A4s6	1.903	0.414
hAlb-hIL2_A4s7	> 50	2.689
hAlb-hIL2_A4s8	0.807	0.236

Entre las variantes de hAlb-hIL2_A4s probadas en los Ejemplos 2 y 3, los inventores han seleccionado hAlb-hIL2_A4s8 para caracterización adicional debido a los resultados prometedores generales mostrados en las FIGURAS 1A a 3B.

Ejemplo 4: Unión de hAlb-hIL2, hAlb-hIL2_A4 y hAlb-hIL2_A4s8 a hIL2Rα (CD25) y hIL2Rβ (CD122) recombinantes

La capacidad de unión de hAlb-hIL2, hAlb-hIL2_A4 de tipo natural codificadas con ARNm (diseñados para reducir la unión de CD25) y hAlb-hIL2_A4s8 (diseñado para reducir la unión de CD25 y la unión de CD122 incrementada) a hIL2Rα (CD25) y hIL2Rβ (CD122) se analizaron por el ELISA (FIGURAS 4A-4B). En este punto, 1 µg/mL de CD25 humana recombinante (C-Fc, Novoprotein cat no. CJ78) o CD122 humana (C-Fc, Novoprotein cat. no. CJ82) se recubrió durante la noche en 100 µL de D-PBS a placas de 96 pocillos de alta unión de proteína Nunc MaxiSorp^{MR}, Thermo Fisher Scientific, cat. no. 439454). Los sobrenadantes que contienen la variante de hAlb-hIL2 generados como se describe en el Ejemplo 2 se aplicaron a CD25 o CD122 recubierta y la proteína de unión se detectó a través de un anticuerpo de albúmina en suero anti-humano conjugado con HRP (Abcam, cat. no. ab8941). Los reactivos ELISA generales y los procedimientos se aplicaron de acuerdo con el protocolo

del Kit de Reactivo Ancilar 2 DuoSet ELISA (R&D Systems, cat. No. DY008).

La unión a hIL2R α (CD25) solo se detectó para la hAlb-hIL2, de tipo natural, mientras que las dos variantes hAlb-hIL2_A4 y hAlb-hIL2_A4s8 que llevan las mutaciones K43E y E61K para la unión de hIL2R α reducida no mostraron ninguna unión (FIGURA 4A). En contraste, hIL2R β (CD122) se unió solo por la hAlb-hIL2_A4s8 equipada con las mutaciones para la unión de hIL2R β incrementada (Q74H, L80F, R81E, L85V, I92F), pero no por hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4 (FIGURA 4B). Tomados conjuntamente, ambos resultados confirman claramente la funcionalidad de las mutaciones que se introdujeron en hAlb-hIL2_A4s8 a tanto la unión disminuida con hIL2R α y la unión incrementada a hIL2R β .

10 **Ejemplo 5: Actividad funcional y “sesgo de células T reguladoras” de hAlb-hIL2_A4s8 comparada con hAlb-hIL2 en diferentes subconjuntos de células en las PBMCs humanas y PBMCs de ratón medidas por fosforilación mediada por IL2 de STAT5.**

La actividad funcional de hAlb-hIL2_A4s8 en comparación con la hAlb-hIL2 de tipo natural se evaluó en las células CD4⁺CD25⁺ T_{reg}, células T CD8⁺ CD25 negativas y células NK CD56⁺ en PBMCs humanas (FIGURAS 5A-5C) así como células CD4⁺CD25⁺ T_{reg} y células T CD8⁺ negativas de CD25 en PBMCs de ratón (FIGURAS 6A-6B). Para las PBMCs humanas, la fosforilación mediada por IL2 de STAT5 inducida por el sobrenadante que contiene la variante de hAlb-hIL2 se analizó como se describe en el Ejemplo 2. Las curvas de dosis-respuesta resultantes se ajustaron con un ajuste logarítmico de cuatro parámetros para calcular los valores EC₅₀ en el GraphPad Prism versión 6.04 (GraphPad Software, Inc.). Las curvas de dosis-respuesta para hAlb-hIL2 en las células T CD8⁺ y las células NK CD56⁺ se intrapolaron para concentraciones de sobrenadantes arriba de 12.5% a fin de estimar los valores EC₅₀ (Tabla 4). La relación de los valores EC₅₀ determinados por hAlb-hIL2 o hAlb-hIL2_A4s8 en las células T CD8⁺ o células NK CD56⁺ versus valores EC₅₀ determinados en células CD4⁺CD25⁺ T_{reg} se calculó para determinar el “sesgo de células T reguladoras” de hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4s8 (Tabla 5). Para el aislamiento de las PBMCs de ratón, 2-3 ratones Balb/c (Balb/c JRj, Janvier Labs) se sacrificaron por dislocación cervical, se les extrajo sangre terminalmente y la sangre entera se recolectó en tubos de Li-Heparin (Microvette^{MR}, VWR International, cat. no. SARS20.1309). 2.5 mL de la sangre se mezcló 1:1 con D-PBS y las PBMCs se aislaron por centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque (1.084, cat. no. 17-5446-02). Las PBMCs aisladas se lavaron dos veces con D-PBS y se recolectaron por centrifugación durante 8 min, 300 ×g a temperatura ambiente. La fosforilación mediada por IL2 de STAT5 en las PBMCs de ratón tratadas con sobrenadante que contiene la variante de hAlb-hIL2 se analizó como se describe para los esplenocitos de ratón en el Ejemplo 2.

35 En línea con los datos ELISA dados en el Ejemplo 4, hAlb-hIL2 mostró potencia superior en las CD4⁺CD25⁺ T_{regs} humanas (FIGURA 5A) pero mostró solo una actividad muy limitada en las células T CD8⁺ CD25 negativas y las células NK CD56⁺ (FIGURAS 5B-5C). En

contraste, hAlb-hIL2_A4s8 mostró una bioactividad reducida de 10 veces en $CD4^+CD25^+$ T_{reg} s comparada con hAlb-hIL2 (FIGURA 5A) pero superó hAlb-hIL2 en las células inmunitarias CD25-negativas (células T $CD8^+$ y células NK $CD56^+$, FIGURAS 5B-5C). La comparación de los valores EC_{50} en $CD4^+CD25^+$ T_{reg} s versus subconjunto de células CD25-negativas se utilizó para calcular el “sesgo de células T reguladoras” tanto para hAlb-hIL2 como hAlb-hIL2_A4s8 (Tabla 4 y Tabla 5). hAlb-hIL2 muestra un sesgo calculado de más de 400 veces hacia $CD4^+CD25^+$ T_{reg} s cuando se comparó con su efecto biológico en las células T citotóxicas $CD8^+$ y las células NK $CD56^+$. En contraste, el sesgo de las células T reguladoras se reduce en gran medida a solo 1.3 a 3.1 veces para hAlb-hIL2_A4s8 dependiendo de los subconjuntos de células inmunitarias compradoras respectivas. En consecuencia, hAlb-hIL2_A4s8 designada con las mutaciones puntuales que disminuyen la unión de hIL2R α (K43E, E61K) mientras que incrementa la unión de hIL2R β (Q74H, L80F, R81E, L85V, I92F) se confirmó que es una variante de sesgada hIL2R β - de hAlb-hIL2 que muestra una capacidad marcadamente reducida para activar las $CD4^+CD25^+$ Tregs que provienen junto con la capacidad de estimular las células inmunitarias efectoras (por ejemplo células T $CD8^+$) en bajas concentraciones. En las PBMCs de ratón, los resultados comparables se obtuvieron con respecto al desempeño de hAlb-hIL2_A4s8 versus hAlb-hIL2. hAlb-hIL2 superó por mucho hAlb-hIL2_A4s8 en las $CD4^+CD25^+$ T_{reg} s, mientras que hAlb-hIL2_A4s8 fue superior a hAlb-hIL2 en las células T $CD8^+$ de ratón (FIGURAS 6A-6B).

Tabla 4: Valores EC_{50} [% de sobrenadante] calculados basados en la dosis-respuesta de fosforilación STAT5 para hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4s8 en diferentes subconjuntos de PBMC humanas.

Variante de hAlb-hIL2	Células $CD4^+CD25^+$ T_{reg}	Células $CD8^+$ T	Células $CD56^+$ NK
hAlb-hIL2	0.0311	25.68 *	12.99 *
hAlb-hIL2_A4s8	0.360	1.471	0.476

* valor EC_{50} proyectada

Tabla 5: El “sesgo de células T reguladoras” de hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4s8 dada como una potencia reducida de veces en las células T $CD8^+$ humanas o células NK $CD56^+$ comparadas con las células $CD4^+CD25^+$ T_{reg} .

Variante de hAlb-hIL2	Células T $CD8^+$	Células NK $CD56^+$
hAlb-hIL2	825 veces *	418 veces *
hAlb-hIL2_A4s8	3.1 veces	1.3 veces

* aproximación; calculadas sobre la base de los valores EC_{50} proyectados

Ejemplo 6: La variante de IL2 hAlb-hIL2_A4s8 con mutaciones combinadas en las regiones de unión de hILR α y hILR β es superior a hAlb-hIL2 en reforzar la inmunidad anti-tumoral en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

5 Los inventores caracterizaron subsecuentemente la potencia de la variante de IL2 seleccionada hAlb-hIL2_A4s8 para mejorar la eficacia antitumoral terapéutica de una vacuna de ARN *in vivo*. Ratones BALB/c (n=11 por grupo) se inocularon con 5×10^5 células tumorales CT26 subcutáneamente (s.c.) y se vacunaron intravenosamente (i.v.) cuatro veces a la semana (día 10, 17, 24 y 31) con 20 μ g de RNA-LPX que codifica el antígeno de células T

10 CD8⁺ gp70 (SPSYAYHQF) como se describe en Kranz y colaboradores (Kranz, L. M. y colaboradores *Nature* **534**, 396–401 (2016)). gp70 es un antígeno tumoral que se puede encontrar en la línea de células de carcinoma de colon CT26. La eficacia anti-tumoral de una vacuna de dirección a gp70 se incrementa con números crecientes de células T específicas de gp70 inducidas (Kranz, L. M. y colaboradores *Nature* **534**, 396–401 (2016) y publicadas).

15 Concomitantemente con la vacuna de ARN, los ARNs que codifican para hAlb-hIL2_A4s8 o hAlb-hIL2 (3 μ g cada uno) y formuladas como nanopartículas empíricas (LNPs) se administraron i.v.. El grupo de control recibió la vacuna de ARN y hAlb ARN (no codifica para ninguna citoquina) formulada como LNPs. Los subconjuntos de linfocitos de sangre y de respuesta de células T específicas de gp70 se determinaron siete días después de los

20 primeros tres tratamientos (día 17, 24 y 31) a través de citometría de flujo (BD FACSCelesta) (tinción como se describe en Kranz, L. M. y colaboradores *Nature* **534**, 396–401 (2016)). La eficacia anti-tumoral se determinó como la inhibición de crecimiento tumoral en los grupos de prueba comparados con el grupo de control y la supervivencia general durante un periodo de observación de hasta 104 días después de la inoculación tumoral.

25 El tratamiento de combinación de la vacuna con hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4s8 dio por resultado crecimiento tumoral significativamente reducido y con supervivencia prolongada comparada con el control (FIGURA 7A, 7B). En el grupo tratado con hAlb-hIL2, siete de 11 animales (64%) mostraron una respuesta completa. Se observó el efecto más potente en el grupo tratado con hAlb-hIL2_A4s8, conduciendo a una respuesta completa en 11 de 11

30 animales (100%). En comparación, todos los ratones en el grupo de control tuvieron que ser sacrificados antes del día 39.

Las células T específicas de antígeno tumoral y las células NK desempeñan funciones importantes en el control tumoral mientras que las células T_{reg} se sabe que inhiben la inmunidad anti-tumoral. Los números de células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral gp70

35 incrementadas se observaron en los grupos tratados con hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4s8 a través de todos los días de medición (FIGURA 8A). De acuerdo con el perfil de unión de IL2R solo hAlb-hIL2_A4s8 dio por resultado una expansión potente de células NK siete días después del

primer tratamiento (día 17). Las células NK, una vez activadas, desaparecieron rápidamente de la sangre lo que explica la reducción significativa de los números de células NK en el día 24 (FIGURA 8B). Tanto hAlb-hIL2 como hAlb-hIL2_A4s8 condujeron a un incremento significativo de células T CD8⁺ no específico para gp70 (específico no de antígeno), con hAlb-hIL2_A4s8 que induce las expansiones de células más potentes (FIGURA 9A). Las células T CD4⁺ no se elevaron por el tratamiento con hAlb-hIL2 o hAlb-hIL2_A4s8. Solo hAlb-hIL2 pero no hAlb-hIL2_A4s8 condujo a una expresión de células T_{reg}. La relación de las células T efectoras a T_{reg} células impacta críticamente la eficacia de las inmunoterapias basadas en células T. hAlb-hIL2 y hAlb-hIL2_A4s8 ambas e igualmente mejoraron la relación de células T específicas de gp70 sobre las células T_{reg}. Además, el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 incrementó la relación de células T CD8⁺ no específicas de gp70 a las células T_{reg} (FIGURA 9B).

En resumen, en combinación con una vacuna específica de antígeno, tanto hAlb-hIL2 como la variante de hAlb-hIL2_A4s8 dieron por resultado un control tumoral con hAlb-hIL2_A4s8 que es más eficaz. Mientras que hAlb-hIL2 incrementa principalmente las células T específicas de antígeno y las células T_{reg}, hAlb-hIL2_A4s8 activa las células NK y eleva tanto los números de células T CD8⁺ específicas de antígeno y no específicas de antígeno sin expandir las células T_{reg}.

Ejemplo 7: La variante de IL2 hAlb-hIL2_A4s8 mejora la inmunidad anti-tumoral como monoterapia en el modelo de carcinoma de colon murino CT26.

Los inventores investigaron además si hAlb-hIL2_A4s8 fue eficiente como monoterapia. Ratones BALB/c (n=11 por grupo) se inocularon con 5×10⁵ células tumorales CT26 subcutáneamente (s.c.) y se trataron intravenosamente (i.v.) cuatro veces a la semana (días 10, 17, 24 y 31) con ARN que codifica para hAlb-hIL2_A4s8 y se formularon como LNP, con o sin vacunación i.v. concomitante con 20 µg de gp70 RNA-LPX descrito en el Ejemplo 6. El grupo de control recibió hAlb ARN (no codifica para ninguna citoquina) formulado como LNPs y una vacuna de ARN que no codifica para cualquier antígeno (vacuna irr), o vacuna gp70 sola. Los subconjuntos de linfocitos de sangre y respuestas de células T específicas de gp70 se determinaron siete días después de los primeros tres tratamientos (día 17, 24 y 31) a través de citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 6. La eficacia antitumoral se determinó como la inhibición de crecimiento tumoral en los grupos de prueba comparadas con el grupo de control y la supervivencia general durante un período de observación de hasta 100 días después de la inoculación tumoral.

El tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 dio por resultado crecimiento tumoral significativamente reducido y supervivencia prolongada comparada con el control que recibe hAlb con la vacuna irr o la vacuna gp70 sola (FIGURA 10A, 10B). En el grupo tratado con hAlb y la vacuna irr, uno de 11 animales (9%) rechazó el tumor y sobrevivió hasta el día 100. En el grupo tratado con la vacuna de gp70, dos de 11 animales (18%) sobrevivieron a este periodo.

En el grupo que recibió hAlb-hIL2_A4s8 como monoterapia, la inhibición de crecimiento tumoral y la supervivencia mejoró de cinco de 11 (45%) ratones. La combinación de hAlb-hIL2_A4s8 con la vacunación gp70 incrementó la fracción de las respuestas completas adicionalmente, y 10 de 11 (91%) animales rechazaron sus tumores y sobrevivieron.

5 Similarmente al estudio previo (Ejemplo 6), el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 combinado con la vacuna de gp70 condujo a un incremento drástico de las células T CD8⁺ específicas de antígeno y los números de células NK después del primer tratamiento y a través del primer tratamiento y a través del tiempo (FIGURA 11A, 11B). hAlb-hIL2_A4s8 sola también incrementó el número de células T CD8⁺ específicas de antígeno, pero solo
10 ligeramente, aunque significativamente (FIGURA 11A, FIGURA 12A). hAlb-hIL2_A4s8 sola también expandió las células NK igualmente también como la combinación. Nuevamente, las células NK desaparecieron rápidamente de la sangre después de la expansión inicial. Las células T_{reg}, como se muestra antes, no se expandió por el tratamiento de hAlb-hIL2_A4s8, y se redujo adicionalmente con el tratamiento continuo (FIGURA 11C). Similarmente a la
15 combinación con la vacuna de gp70, hAlb-hIL2_A4s8 se expandieron en el número de células T CD8⁺ mientras que no cambia el número de células T CD4⁺ (FIGURA 12A). la expansión específica de antígeno así como las células T CD8⁺ totales mientras que se estabilizan en el número de células T_{reg} condujo a un incremento altamente significativo de la relación de células T CD8⁺ a células T_{reg} específicas de antígeno, así como la relación de células T CD8⁺ sobre las células T_{reg} (FIGURA 12B). Mientras que la monoterapia de hAlb-hIL2_A4s8 expandió las células T CD8⁺ independiente de su especificidad de antígeno, la combinación con la vacuna gp70 se sinergizó en expandir de manera preferente las células T CD8⁺ específicas de gp70 sobre las células T CD8⁺ no específicas de gp70 (FIGURA 12C). La
20 vacunación de gp70 sola no indujo ninguna alteración medible de los subconjuntos de células analizados.
25

Tomados conjuntamente se muestra que el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 conduce a un incremento potente de células T CD8⁺ y células NK sin ningún incremento medible de las células T_{reg} a su vez, dando por resultado de esa manera una eficacia anti-tumoral como monoterapia en combinación con una vacuna de células T específicas de antígeno tumoral.

30 **Ejemplo 8: La variante de IL2 hAlb-hIL2_A4s8 es superior a hAlb-hIL2 en reforzar la inmunidad anti-tumoral en combinación con una vacuna de ARN terapéutica en el modelo de melanoma murino B16.**

A fin de confirmar la potencia de hAlb-hIL2_A4s8 en un modelo de tumor murino inmunogénico bajo, ratones C57BL/6 (n=15 por grupo) se inocularon subcutáneamente (s.c.)
35 con 3×10⁵ células de melanoma B16-F10 y se trataron intravenosamente (i.v.) cinco veces a la semana (días 8, 15, 22, 29 y 36) con ARN que codifica para hAlb-hIL2_A4s8 o hAlb-hIL2 formuladas como LNP, con o sin vacunación i.v. concomitante con 20 µg de TRP1 ARN-LPX.

TRP1 es la proteína 1 relacionada con tirosina del antígeno melanosómico murino y es un autoantígeno expresado constitutivamente en las células de melanoma B16-F10 así como en los melanocitos normales. La eficacia anti-tumoral de esta vacuna de TRP1 se mostró por Kranz y colaboradores (Kranz, L. M. y colaboradores *Nature* **534**, 396–401 (2016)). Los grupos de control recibieron hAlb ARN (no codifica para ninguna citoquina) formulados como LNPs y una vacuna de ARN que no codifica para ningún antígeno (vacuna), o hAlb con la vacuna TRP1. Los subconjuntos de linfocitos de sangre y la respuesta de células T específicas de TRP1 se determinaron siete días después de los primeros tres tratamientos (días 15, 22 y 29) a través de citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 6. Se determinó la eficacia anti-tumoral como inhibición del crecimiento tumoral en los grupos de prueba comparados con el grupo de control y la supervivencia general durante un periodo de observación de hasta el día 75 después de la inoculación tumoral.

Comparado con el grupo de control tratado con hAlb y la vacuna irr, la vacunación de TRP1 sola mostró poca eficacia terapéutica con una tendencia modesta para la reducción de crecimiento tumoral y la supervivencia médica incrementada (FIGURA 13A, 13B). El tratamiento tanto con hAlb-hIL2 como Alb-hIL2_A4s8 condujo a una reducción de crecimiento tumoral significativo dando por resultado rechazo completo de los tumores, en cinco de 15 (33%) animales para ambos tratamientos. Mientras que la vacunación con TRP1 no mejoró la supervivencia de los animales tratados con hAlb-hIL2, el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 se benefició de la vacunación de TRP1 simultánea, dando por resultado reducción de crecimiento tumoral adicional y supervivencia en gran medida mejorada comparada con cada una de la terapia individual. De los animales tratados con la combinación de hAlb-hIL2_A4s8 y la vacuna de TRP1, seis de 15 (40%) rechazaron su tumor y 50% sobrevivieron al periodo de observación.

El tratamiento con hAlb-hIL2 o hAlb-hIL2-A4s8 solo no indujo las células T CD8⁺ específicas de TRP1, mientras que la vacunación con TRP1 dio por resultado una respuesta de células T CD8⁺ específicas de TRP1 débil (FIGURA 14A). Como se observa en el modelo de carcinoma de colon (Ejemplo 6 y Ejemplo 7), la combinación de hAlb-hIL2_A4s8 con la vacuna de TRP1 reforzó en gran medida los números de células T CD8⁺ específicas de TRP1 a través del tiempo. A pesar de los números iniciales más altos de células T CD8⁺ específicas de TRP1, la combinación de hAlb-hIL2 con la vacuna de TRP1 tomó más tiempo para que las células T CD8⁺ específicas de TRP1 alcancen niveles similares a hAlb-hIL2_A4s8 a través del tiempo. Nuevamente, las células NK expandidas en hAlb-hIL2_A4s8 después del primer tratamiento, que se redujo a niveles de valor de referencia subsecuentemente (FIGURA 14B). Ni solo en combinación con la vacuna TRP1, la hAlb-hIL2_A4s8 expandió las células T_{reg}, mientras que la hAlb-hIL2 aumentó el número de células T_{reg} después del primer tratamiento (FIGURA 14C). La expansión inicial de las células T_{reg} por hAlb-hIL2 puede explicar el

incremento retardado en las células CD8⁺ específicas de TRP1 observado en la FIGURA 14A, basado en el modelo de ratón más sensible y susceptible a T_{reg}. Confirmando los experimentos previos, tanto hAlb-hIL2 como hAlb-hIL2_A4s8 solas o en combinación incrementaron significativamente el número de células T CD8⁺ totales, donde hAlb-hIL2_A4s8 fue superior, y solo hAlb-hIL2 afectó el número de T CD4⁺ (FIGURA 15A). Como se observa en lo anterior, la expansión de estos subconjuntos de células T CD8⁺ dio por resultado relaciones de célula T CD8⁺ a células T_{reg} totales preferenciales en respuesta al tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 sola o en combinación con la vacuna de TRP1 (FIGURA 15B). Mientras que el tratamiento con ya sea hAlb-hIL2 sola, hAlb-hIL2_A4s8 o la vacuna de TRP1 sola no tuvo nada o solo poco efecto en la relación de las células T CD8⁺ específicas de antígeno sobre las células T_{reg}, la combinación reforzó esta relación en favor de las células T CD8⁺ específicas de antígeno y la incrementó además con tratamiento continuo, tanto para hAlb-hIL2 como hAlb-hIL2_A4s8 (FIGURA 15B). Similarmente, las observaciones en el modelo de carcinoma de colon (Ejemplo 7, FIGURA 12C), la monoterapia de hAlb-hIL2_A4s8 expandió las células T CD8⁺ independiente de su especificidad de antígeno, mientras que la combinación con la vacuna TRP1 se sinergizó en expandir de manera preferente las células T CD8⁺ específicas de TRP1 sobre las células T CD8⁺ específicas no de TRP1 (FIGURA 15C). Lo mismo fue cierto para el tratamiento con hAlb-hIL2 y la combinación con la vacuna de TRP1.

En resumen, hAlb-hIL2_A4s8 es eficaz como monoterapia también en un modelo de tumor inmunogénico bajo y, en contraste con hAlb-hIL2, se sinergiza con la vacunación de células T al expandir la respuesta de células T inducidas por vacuna mientras que evita la estimulación y expansión de las células T_{reg}.

Ejemplo 9: La variante de IL2 hAlb-hIL2_A4s8 refuerza la inmunidad anti-tumoral sola y en combinación con el bloqueo de PD-L1 en el modelo de carcinoma de colon murino MC38.

Ya que múltiples estudios han mostrado que IL2 o las variantes de IL2 modificadas se sinergizan con los anticuerpos de bloqueo PD-1/PD-L1 (Moynihan, KD y colaboradores Nat. Med. 22(12):1402–10 (2016)), Castro, DT y colaboradores SITC Abstract #P557 (2018)), los inventores anticiparon que la potencia de hAlb-hIL2_A4s8 podría aumentar adicionalmente por combinación con el bloque de punto de control inmunitario. Los ratones C57BL/6 (n=14 por grupo) se inocularon subcutáneamente (s.c.) con 7.5×10⁵ células de carcinoma de colon MC38 y se trataron intravenosamente (i.v.) cuatro veces a la semana (día 17, 24, 32 y 39) con ARN que codifica para hAlb-hIL2_A4s8 y se formularon como LNP, con o sin tratamiento intraperitoneal concomitante (i.p.) con un anticuerpo anti-PD-L1 (primer inyección 200 µg, luego 100 µg para todas las inyecciones consecutivas). Los grupos de control recibieron hAlb ARN (no codifica para ninguna citoquina) formulada como LNPs y el anticuerpo de control de

isotipo, así como hAlb y anti-PD-L1. En los subconjuntos de linfocitos de sangre y la respuesta de células T específicas de Adpgk se determinaron siete días después del segundo tratamiento (día 31) a través de citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 6. Adpgk es un neoantígeno expresado específicamente por las células tumorales MC38 pero no las células normales (Yadav, M y colaboradores, Nature 515(7528):572-6 (2014)). La eficacia anti-tumoral se determinó como inhibición de crecimiento tumoral en los grupos de prueba comparados con los grupos de control y la supervivencia general durante un periodo de observación de hasta el día 74 después de la inoculación tumoral.

Comparados con el grupo de control tratados con hAlb y anticuerpo de control de isotipo, hAlb-hIL2_A4s8 y el tratamiento con anti-PD-L1 solo mostró una tendencia para el crecimiento tumoral reducido y supervivencia incrementada (FIGURA 16A, 16B). La combinación de hAlb-hIL2_A4s8 y anti-PD-L1 se sinergizó en gran medida y mejoró el efecto anti-tumoral de anti-PD-L1. Con la combinación, nueve de 14 (64%) animales rechazaron sus tumores. Ninguno de los tumores fue rechazado en el grupo de control.

El tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 sola elevó los números de células T CD8⁺, lo cual fue significativamente más alto que en el grupo de control cuando se combinó con el tratamiento con el anticuerpo (FIGURA 17A). Similarmente, las células T CD8⁺ específicas de antígeno para el neoantígeno específico de tumor Adpgk se expandieron arriba del nivel de fondo por hAlb-hIL2_A4s8 solos, y se reforzaron significativamente cuando se combinaron con el anticuerpo anti-PD-L1. El tratamiento no afectó el número de células T CD4⁺, y los números de células T_{reg} permanecieron iguales sin efecto por el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 (FIGURA 17A). Las relaciones de las células T CD8⁺ totales, y las células T CD8⁺ específicas de antígeno sobre las células T_{reg} perfiladas del tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8, con la tendencia para el anticuerpo anti-PD-L1 que es benéfico en la parte superior (FIGURA 17B). El anti-PD-L1 solo no afectó ninguno de los subconjuntos o relaciones celulares analizados.

Tomados conjuntamente, hAlb-hIL2_A4s8 mejoró la eficacia antitumoral del bloqueo de punto de control inmunitario PD-L1 al expandir las células T CD8⁺, y las células T CD8⁺ específicas de antígeno específicamente preexistentes.

Ejemplo 10: Tratamiento con monoterapia de hAlb-hIL2-A4s8 o en combinación con el bloque de punto de control PD-L1 de la vacunación de ARN terapéutica modula los números de linfocitos en el tumor en el modelo de tumor murino MC38.

En los ejemplos previos, los inventores determinaron el efecto de hAlb-hIL2_A4s8 sola o en combinación con la vacunación de ARN, o el bloqueo de punto de control de PD-L1 en el crecimiento tumoral, supervivencia y números de linfocitos en la sangre. La actividad terapéutica se asoció con un incremento en los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, células NK y células específicas de antígeno tumoral. No se observó incremento significativo en las células T_{reg}, lo cual condujo a un incremento general de la relación de célula T a célula T_{reg}. Sin embargo,

mientras que el incremento de los linfocitos efectores en la sangre también corresponde a un incremento en el tumor donde se cree que promueven el exterminio de células tumorales, no se mostró hasta ahora.

En este experimento, la modulación del microentorno tumoral se investigó tras el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 en el modelo de carcinoma de colon altamente inmunogénico MC38. Los tumores MC38 contienen varios neoantígenos mutados reconocidos por las células T CD8⁺ que se originan de los genes de mutación puntual (Yadav, M. y colaboradores Nature 515, 572-576 (2014); Capietto, A. y colaboradores The Journal of experimental medicine 217, e20190179 (2020)). Como se describe en el Ejemplo 9, el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 sinergiza con el bloqueo de punto de control de PD-L1 se incrementa la inducción de la respuesta de células T contra los neoantígenos específicos de tumor en la sangre (FIGURAS 17A-17B). Un experimento subsecuente en los ratones que llevan tumor MC38 se llevó a cabo para analizar la infiltración de las células T específicas de neoantígeno tumoral en el tumor.

Los ratones C57BL/6 (n=7-8 por grupo) se inculcaron subcutáneamente (s.c.) con 7.5×10⁵ células de carcinoma de colon MC38 y 19 días después se trataron i.v. con el ARN formulado con el LNP que codifica para ARN hAlb-hIL2_A4s8 (3 µg) y el tratamiento i.p. concomitante con el anticuerpo anti-PD-L1 (200 µg). Los grupos de control recibieron una de las dos terapias o no recibieron tratamiento en absoluto (control para hAlb-hIL2_A4s8: hAlb ARN formulada como LNPs ('hAlb'); control para el anticuerpo anti-PD-L1: anticuerpo de isotipo ('iso')). El tumor y la sangre de los ratones se muestrearon en el día 24 y se analizaron por citometría de flujo (BD FACSCelesta). La sangre se procesó y se tiñó como se describe en lo anterior (Kranz, L. M. y colaboradores Nature 534, 396–401 (2016)). Los tumores se digirieron utilizando el Kit de Disociación del Tumor, de ratón (Miltenyi Biotec) y el Disociador GentleMACS^{MR} (Miltenyi Biotec, Cat. 130-093-235). Tras la lisis de eritrocitos con la solución amortiguadora ACK (8.25 g de NH₄CL, 1g de KHCO₃, 0.2 ml de EDTA, 1 L de H₂O destilada), se tiñeron para análisis de citometría de flujo como se describe en lo anterior (Kranz, L. M. y colaboradores Nature 534, 396–401 (2016)). El análisis se llevó utilizando el software FlowJo versión 10 y GraphPad Prism versión 8.

Como se muestra en la FIGURA 18A y 18B, las células T CD8⁺ y células NK en el tumor se elevaron significativamente en todos los grupos tratados con hAlb-hIL2_A4s8. La combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 (αPD-L1) elevó adicionalmente los números de células T aunque el bloqueo de PD-L1 en sí mismo no tuvo efecto. En este modelo, no se detectó elevación significativa de las células T CD4⁺ intratumorales (FIGURA 18C). Como se observó en los tumores TC-1, la fracción de T_{reg} intratumoral entre las células T CD4⁺ no se alteró por ninguno de los tratamientos, dando por resultado un incremento general de la relación de célula T CD8⁺ a célula T_{reg} en el tumor tras la administración de hAlb-hIL2_A4s8 (FIGURA 18D y 18E). De manera importante, las células T CD8⁺ específicas de tumor que

reconocen neoantígenos derivados de Adpgk mutados, Rpl18 o N4pb2l2 se elevaron significativamente en ambos de los grupos tratados con hAlb-hIL2_A4s8 (FIGURAS 18F-18H). Similarmente, el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 dio por resultado números incrementados de células T CD8⁺ y CD4⁺ así como Adpgk, células T específicas de antígeno Rpl18 y N4pb2l2 en la sangre (FIGURAS 18I-18M).

En resumen, el tratamiento con hAlb-hIL2_A4s8 solo o en combinación con el bloqueo de punto de control de PD-L1 y/o vacunación de ARN coincidieron con un incremento de células T efectoras (específicas de antígeno tumoral) y células NK en el tumor y la sangre.

10

15

20

25

30

35