



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021000811-0 A2



(22) Data do Depósito: 19/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) Título: AGONISTAS DE IL2

(51) Int. Cl.: C07K 14/55; A61K 38/20; A61P 35/00; A61K 39/00; A61K 39/39.

(30) Prioridade Unionista: 24/07/2018 EP PCT /EP2018/070068.

(71) Depositante(es): BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH; TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ GEMEINNÜTZIGE GMBH.

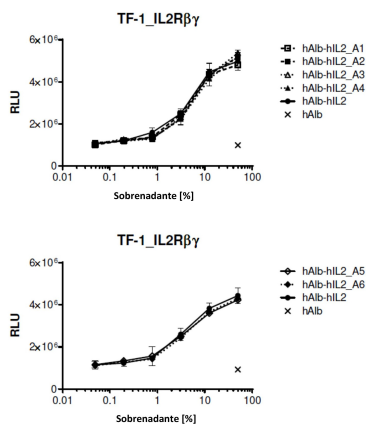
(72) Inventor(es): UGUR SAHIN; MATHIAS VORMEHR; LENA MAREEN KRANZ; SINA FELLERMEIER-KOPF; ALEXANDER MUIK; FRIEDERIKE GIESEKE; BODO TILLMANN; SONJA WITZEL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019069541 de 19/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/020783 de 30/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 15/01/2021

(57) Resumo: AGONISTAS DE IL2. A invenção se refere a variantes de interleucina-2 (IL2). Em uma concretização, as variantes de IL2 ativam células T efetoras sobre células T regulatórias. Em particular, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma muteína de IL2 humana ou de uma variante funcional de IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma posição tendo um resíduo de aminoácido ácido ou básico no tipo selvagem IL2 humana que contata a subunidade alfa do complexo receptor $\alpha\beta$ IL2 (IL2Ra β). A invenção também se refere a polinucleotídeos que codificam para os polipeptídeos da invenção, células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos, composições farmacêuticas compreendendo os polipeptídeos, polinucleotídeos ou células hospedeiras, métodos terapêuticos ou profiláticos de tratamento usando os polipeptídeos, polinucleotídeos, células hospedeiras ou composições farmacêuticas e médicas preparações compreendendo os polipeptídeos, polinucleotídeos, células hospedeiras ou composições farmacêuticas.



AGONISTAS DE IL2

Campo técnico

[001] A invenção se refere a variantes de interleucina-2 (IL2). Em particular, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma muteína de IL2 humana ou de uma variante funcional de IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma posição tendo um resíduo de aminoácido ácido ou básico na IL2 humana tipo selvagem que contata a subunidade alfa do complexo de receptor de IL2 $\alpha\beta\gamma$ ((IL2R $\alpha\beta\gamma$). Em uma concretização, a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$, de preferência, em maior extensão do que para o complexo de receptor de IL2 $\beta\gamma$ (IL2R $\beta\gamma$). Em uma concretização, o polipeptídeo ativa as células T efetoras sobre as células T reguladoras. A invenção também se refere a polinucleotídeos que codificam para os polipeptídeos da invenção, células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos, composições farmacêuticas compreendendo os polipeptídeos, polinucleotídeos ou células hospedeiras, métodos terapêuticos ou profiláticos de tratamento usando os polipeptídeos, polinucleotídeos, células hospedeiras ou composições farmacêuticas e médicas preparações compreendendo os polipeptídeos, polinucleotídeos, células hospedeiras ou composições farmacêuticas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O sistema imunológico desempenha um papel importante no câncer, autoimunidade, alergia, bem como em doenças associadas a patógenos. As células T e as células NK são mediadoras importantes das respostas imunes

antitumorais. As células T CD8+ e as células NK podem lisar diretamente as células tumorais. As células T CD4+, por outro lado, podem mediar o influxo de diferentes subconjuntos imunológicos, incluindo células T CD8+ e células NK no tumor. As células T CD4+ são capazes de licenciar células dendríticas (DCs) para a iniciação de respostas de células T CD8+ antitumorais e podem atuar diretamente nas células tumorais por meio da suprarregulação de MHC mediada por IFN γ e inibição do crescimento. As respostas de células T CD8+ específicas de tumor, bem como CD4+, podem ser induzidas por meio de vacinação ou por transferência adotiva de células T. No contexto de uma plataforma de vacina baseada em mRNA, mRNA pode ser entregue via formulação lipossomal (RNA-lipoplexos, RNA-LPX) em células apresentadoras de antígeno localizadas em órgãos linfoides secundários, sem necessidade de qualquer adjuvante adicional para estimulação imunológica (Kreiter, S. et al. *Nature* 520, 692-696 (2015); Kranz, LM et al. *Nature* 534, 396-401 (2016)).

[003] As citocinas desempenham um papel importante na imunidade. Por exemplo, a interleucina-2 (IL2) é um potente estimulador imunológico, ativando diversas células do sistema imunológico, incluindo células T, células B, monócitos e células *natural killer* (NK). IL2 é conhecida por apoiar a diferenciação, proliferação, sobrevivência e funções efetoras de células T e células NK (Blattman, JN et al. *Nat. Med.* 9, 540-7 (2003)) e tem sido usada por décadas no tratamento de melanoma maligno de estágio tardio (Maas, RA, Dullens, HF & Den Otter, W. *Cancer Immunol. Immunother.* 36, 141-8 (1993)). Assim, imunoterapias, tais como vacinas

de células T ou transferência adotiva de células T ou células T ou células NK (nativa ou receptor de células T transgênicas ou receptor de antígeno quimérico transgênico) podem se beneficiar da administração simultânea de citocinas como IL2. Uma desvantagem da IL2 recombinante, no entanto, é sua meia-vida plasmática curta (Lotze, MT et al. JAMA 1986, 256, 3117-24 .; West, WH et al. N. Engl. J. Med. 316, 898- 905 (1987)). Isso cria a necessidade de injetar frequentemente grandes quantidades de IL2 levando a efeitos colaterais graves, como a síndrome de vazamento vascular (VLS) (Rosenberg, S. A. et al. N. Engl. J. Med. 316, 889-97 (1987)). A VLS leva ao acúmulo de fluido intravascular nos pulmões e no fígado, resultando em edema pulmonar e lesão hepática. Até recentemente, acreditava-se que a VLS era causada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias de células NK ativadas por IL2. No entanto, um relatório recente aponta para a ligação direta de IL2 às células endoteliais do pulmão, como uma suposta causa de VLS (Krieg et al, PNAS USA 107 (26) 11906-11911 (2010)). Uma segunda desvantagem da IL2 é sua capacidade inerente de estimular células T reguladoras (Tregs). Tregs estão correlacionados com a redução da sobrevida de pacientes com câncer, pois podem suprimir a função das células T efetoras antitumorais e células NK (Nishikawa, H. & Sakaguchi. Curr. Opin. Immunol. 27, 1-7 (2014)). A IL2 sinaliza através do receptor IL2, que existe como uma versão de afinidade alta e intermediária. O receptor de alta afinidade IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$) consiste em CD25 (IL2R α), CD122 (IL2R β) e CD132 (IL2R γ) e é expresso em Tregs, bem como em células T CD4 + e CD8 + ativadas. A ativação de

Treg pode exacerbar a supressão imunológica, comprometendo potencialmente a resposta terapêutica pretendida. O receptor de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) carece de CD25 e é prevalente em células T virgens e de memória, bem como em células NK. Como resultado, IL2 estimula preferencialmente CD25 que expressa Tregs (Todd, J. A. et al. PLoS Med. 13, e1002139 (2016)), bem como células T CD4 + e CD8 + ativadas. Além disso, altas doses de IL2 são necessárias para ativar as células T e NK naíve e de memória. As tentativas de alterar IL2 de forma que ela perca a preferência por células que expressam CD25, aumentando, assim, relativamente o potencial estimulador de células T naíve e de memória, bem como células NK, mostraram melhorar seu potencial antitumoral (Arenas-Ramirez, N. et al. Sci. Transl. Med. 8, 1-13 (2016)).

[004] Há uma necessidade de novas estratégias para aumentar a eficácia das vacinas, em particular, vacinas contra o câncer e outras imunoterapias, em particular, imunoterapias contra o câncer, tais como transferência adotiva de células T e NK (*naíve* ou receptor de células T transgênicas ou receptor de antígeno quimérico transgênico).

[005] Descobrimos variantes de IL2 humana que ativam preferencialmente células que expressam o receptor IL2R $\beta\gamma$ de afinidade intermediária em relação a células que expressam o receptor IL2 de alta afinidade IL2R $\alpha\beta\gamma$.

[006] A interrupção das interações de IL2 com IL2R α por meio de modificação apropriada de resíduos de ligação específicos na superfície de ligação de IL2 foi hipotetizada para evitar a ligação eficaz (e, portanto, ativação) a

células que expressam IL2R $\alpha\beta\gamma$. No entanto, em células que expressam IL2R $\beta\gamma$, a ligação à célula ainda ocorrerá. Espera-se que uma variante de IL2 capaz de ativar seletivamente os receptores de IL2 de afinidade intermediária em certas células T, como células T de memória, células T naïve e células T efetoras, bem como células NK, em preferência, aos receptores de IL2 de alta afinidade em células T regulatórias. um índice terapêutico melhorado sobre a IL2 do tipo selvagem e um perfil de toxicidade reduzido. Uma variante de IL2 com um índice terapêutico melhorado teria uma gama significativamente expandida de uso no tratamento de distúrbios que requerem estimulação do sistema imunológico, por exemplo, no tratamento do câncer (como uma terapia direta e / ou adjuvante). Em particular, a administração de RNA variante de IL2 é uma abordagem promissora para aumentar a eficácia terapêutica de múltiplas imunoterapias baseadas em células T e NK (câncer).

[007] A presente divulgação fornece novas variantes de IL2. Especificamente, são descritas variantes de IL2 que contêm mutações que afetam a ligação de CD25 ("mutCD25") e, opcionalmente, ainda contêm mutações que aumentam a ligação de IL2R $\beta\gamma$ ("mut $\beta\gamma$ "), reduzindo, assim, a expansão de Treg e aumentando a célula T efetora e a estimulação de células NK. *In vitro*, variantes de IL2 mutCD25 mRNA-codificadas induziram proliferação mais fraca de células T positivas IL2R $\alpha\beta\gamma$ do que IL2 de tipo selvagem e demonstraram ligação reduzida a CD25. As variantes Mut $\beta\gamma$ sem mutações mutCD25 aumentaram fortemente a potência para expandir todas as células T, mas também aumentaram a expansão preferencial de

Tregs em comparação com IL2 de tipo selvagem. Importante, combinação de mutCD25 e mutações $\text{mut}\beta\gamma$ resultou em uma forte redução da expansão de Treg mediada por IL2, mantendo a eficácia para expandir células T CD8+, bem como células T FoxP3- CD4+. *In vivo*, o mRNA formulado com nanopartículas que codifica as variantes mutCD25 de IL2 direcionadas ao fígado de camundongos para disponibilidade sistêmica, preferencialmente ou apenas reforçou as respostas de células T efetoras induzidas pela vacinação de RNA-LPX em comparação com Tregs. A combinação de mutações mutCD25 e $\text{mut}\beta\gamma$ aumentou ainda mais a potência das variantes mutCD25 IL2 e levou à expansão preferencial de células T específicas do antígeno com expansão de Treg significativamente mais baixa e taxas de CD8 para Treg aumentadas em comparação com IL2 de tipo selvagem.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] Em uma concretização, as variantes de IL2 são descritas neste relatório descritivo tendo substituições de aminoácidos na região de IL2 que contata a subunidade alfa (a) do complexo heterotrimérico do receptor de IL2, $\text{IL2R}\alpha\beta\gamma$, reduzindo sua capacidade de ligar e ativar o heterotrímico (também denominado aqui e mutações "mutCD25"). O complexo $\text{IL2R}\alpha\beta\gamma$ é expresso constitutivamente em células T reguladoras (Tregs). Portanto, as substituições de IL2 aqui descritas reduzem a afinidade para $\text{IL2R}\alpha\beta\gamma$ em maior extensão do que para $\text{IL2R}\beta\gamma$, o complexo de receptor predominante em células T naive e de memória, bem como em células NK. O tratamento usando as variantes de IL2 aqui descritas *in vivo* favorece a ativação de células T, como células T CD8, em vez

de Tregs no microambiente tumoral para fornecer eficácia antitumoral.

[009] Em um aspecto, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma muteína de Interleucina-2 humana (IL2) ou de uma variante funcional de IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma posição tendo um ácido ou básico resíduo de aminoácido na IL2 humana de tipo selvagem que contata a subunidade alfa do complexo receptor $\alpha\beta\gamma$ de IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$), em que se o resíduo de aminoácido for um resíduo de aminoácido ácido (ácido glutâmico (Glu / E) ou ácido aspártico (Asp / D)), em particular, ácido glutâmico) em IL2 humana de tipo selvagem a substituição é por um resíduo de aminoácido básico (lisina (Lys / K) ou arginina (Arg / R), em particular lisina) e se o resíduo de aminoácido for um aminoácido básico resíduo de ácido (lisina (Lys / K) ou arginina (Arg / R), em particular lisina) na IL2 humana de tipo selvagem, a substituição é por um resíduo de aminoácido ácido (ácido glutâmico (Glu / E) ou ácido aspártico (Asp / D)), em particular ácido glutâmico). Em diferentes concretizações, a IL2 humana ou variante funcional da mesma é substituída em um ou mais, tal como dois ou mais ou três ou mais, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 tais posições tendo um ácido ou básico resíduo de aminoácido na IL2 humana de tipo selvagem que contata a subunidade alfa do complexo de receptor de IL2 $\alpha\beta\gamma$ (IL2R $\alpha\beta\gamma$).

[0010] Em uma concretização, a IL2 humana de tipo selvagem tem a sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 17.

[0011] Em uma concretização, o resíduo de aminoácido ácido em IL2 humana de tipo selvagem contata um resíduo de aminoácido básico na subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$. Em uma concretização, o resíduo de aminoácido básico em IL2 humana de tipo selvagem contata um resíduo de aminoácido ácido em subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$.

[0012] Em uma concretização, a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$. Em uma concretização, a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$ em maior extensão do que para o complexo de receptor de $\beta\gamma$ IL2 (IL2R β).

[0013] Em uma concretização, o polipeptídeo ativa preferencialmente células T efectoras (por exemplo, células T CD8 + e / ou células T CD4 +, como células T CD4 + sendo CD25- e / ou FoxP3-) sobre células T reguladoras (por exemplo, CD4 + CD25 + FoxP3 + Células T).

[0014] Em uma concretização, a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma das posições 35 (lisina), 43 (lisina), 61 (ácido glutâmico) e 62 (ácido glutâmico) em relação à IL2 humana de tipo selvagem e numerada de acordo com IL2 humana de tipo selvagem.

[0015] Em diferentes concretizações, a IL2 humana ou variante funcional da mesma é substituída em pelo menos as seguintes posições:

- posição 35,
- posição 43,
- posição 61,
- posição 62,
- posição 35 e posição 43,
- posição 35 e posição 61,

- posição 35 e posição 62,
- posição 43 e posição 61,
- posição 43 e posição 62,
- posição 61 e posição 62,
- posição 35, posição 43 e posição 61,
- posição 35, posição 43 e posição 62,
- posição 35, posição 61 e posição 62,
- posição 43, posição 61 e posição 62, ou
- posição 35, posição 43, posição 61 e posição 62.

[0016] Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina. Em uma concretização, a posição 62 é substituída por lisina.

[0017] Em uma concretização, a posição 35 é substituída. Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico.

[0018] Em uma concretização, a posição 43 é substituída. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico.

[0019] Em uma concretização, a posição 61 é substituída. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina.

[0020] Em uma concretização, a posição 62 é substituída. Em uma concretização, a posição 62 é substituída por lisina.

[0021] Em uma concretização, as posições 43 e 61 são substituídas. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída

por lisina.

[0022] Em uma concretização, as posições 35, 43 e 61 são substituídas. Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída por lisina.

[0023] Em uma concretização, as posições 61 e 62 são substituídas. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina e a posição 62 é substituída por lisina.

[0024] Em um aspecto, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma muteína da Interleucina-2 humana (IL2) ou de uma variante funcional da IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma das posições 35 (lisina), 43 (lisina), 61 (ácido glutâmico) e 62 (ácido glutâmico) em relação à IL2 humana de tipo selvagem e numerados de acordo com a IL2 humana de tipo selvagem. Em uma concretização, se o resíduo de aminoácido é um resíduo de aminoácido ácido em IL2 humana de tipo selvagem, a substituição é por um resíduo de aminoácido básico e se o resíduo de aminoácido é um resíduo de aminoácido básico em IL2 humana de tipo selvagem a substituição é por um resíduo de aminoácido ácido.

[0025] Em diferentes concretizações, a IL2 humana ou variante funcional da mesma é substituída em pelo menos as seguintes posições:

- posição 35,
- posição 43,
- posição 61,
- posição 62,

- posição 35 e posição 43,
- posição 35 e posição 61,
- posição 35 e posição 62,
- posição 43 e posição 61,
- posição 43 e posição 62,
- posição 61 e posição 62,
- posição 35, posição 43 e posição 61,
- posição 35, posição 43 e posição 62,
- posição 35, posição 61 e posição 62,
- posição 43, posição 61 e posição 62, ou
- posição 35, posição 43, posição 61 e posição 62.

[0026] Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina. Em uma concretização, a posição 62 é substituída por lisina.

[0027] Em uma concretização, a posição 35 é substituída. Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico.

[0028] Em uma concretização, a posição 43 é substituída. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico.

[0029] Em uma concretização, a posição 61 é substituída. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina.

[0030] Em uma concretização, a posição 62 é substituída. Em uma concretização, a posição 62 é substituída por lisina.

[0031] Em uma concretização, as posições 43 e 61 são

substituídas. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída por lisina.

[0032] Em uma concretização, as posições 35, 43 e 61 são substituídas. Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída por lisina.

[0033] Em uma concretização, as posições 61 e 62 são substituídas. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina e a posição 62 é substituída por lisina.

[0034] Em uma concretização, a IL2 humana de tipo selvagem tem a sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 17.

[0035] Em uma concretização, a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$. Em uma concretização, a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$ em maior extensão do que para o complexo de receptor de $\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\beta\gamma$).

[0036] Em uma concretização, o polipeptídeo ativa preferencialmente células T efectoras (por exemplo, células T CD8+ e / ou células T CD4+, como células T CD4+ sendo CD25- e / ou FoxP3-) sobre células T reguladoras (por exemplo, Células T CD4+ CD25+ FoxP3+).

[0037] Em uma concretização, a IL2 substituída ou sua variante funcional (muteína de IL2) descrita acima tem uma sequência de aminoácidos idêntica à IL2 de tipo selvagem nos outros resíduos não substituídos. Em uma concretização, a muteína de IL2 descrita acima tem modificações de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos em um ou

mais locais ou em outros resíduos de IL2 humana de tipo selvagem. Em uma concretização, tais substituições de aminoácidos resultam em afinidade relativamente aumentada para IL2R $\beta\gamma$ em comparação com IL2 de tipo selvagem (também denominadas mutações " mut $\beta\gamma$ " neste relatório descritivo). Esses mutantes são agonistas de sinalização de IL2 potentes. Em uma concretização, tais substituições de aminoácidos são em resíduos de aminoácidos que contatam IL2R β e/ou IL2R γ .

[0038] Em uma concretização, a IL2 humana ou variante funcional desta é substituída em pelo menos uma das posições 24, 65, 74, 80, 81, 85, 86, 89, 92 e 93 em relação à IL2 humana de tipo selvagem e numerada de acordo com IL2 humano de tipo selvagem. O (s) resíduo (s) de aminoácido substituído (s) podem ser, mas não são necessariamente, substituições conservativas. Por exemplo, a mutação pode ser: I24V, P65H, Q74R, Q74H, Q74N, Q74S, L80F, L80V, R81I, R81T, R81D, L85V, I86V, I89V, I92F, V93I.

[0039] Em uma concretização, a muteína IL2 compreende o seguinte conjunto de substituições de aminoácidos: 80F/81D/85V/86V/92F. A muteína IL2 pode ainda compreender a substituição de aminoácido 42A. A muteína IL2 pode compreender ainda uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: 24V, 65H, 74R, 74H, 74N, 74S, 89V, 93I.

[0040] Em algumas concretizações, a muteína IL2 compreende um conjunto de substituições de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em:

- (i) 74N, 80F, 81D, 85V, 86V, 89V, 92F;

- (ii) 74H, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (iii) 74S, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (iv) 74N, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (v) 80F, 81 D, 85V, 86V, 92F;
- (vi) 80F, 81 D, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I;
- (vii) 18R, 22E, 80F, 81 D, 85 V, 86 V, 89 V, 92F, 93I, 126T;
- (viii) 18R, 22E, 74S, 80F, 81T, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I, 126T.

[0041] Em um aspecto, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma muteína da interleucina-2 humana (IL2) ou de uma variante funcional da IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional compreende pelo menos (i) uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ (também denominadas mutações "mutCD25" neste relatório descritivo) e (i) uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$ (também denominadas mutações "mut $\beta\gamma$ " neste relatório descritivo).

[0042] Em uma concretização, o polipeptídeo ativa preferencialmente células T efetoras (por exemplo, células T CD8+ e / ou células T CD4+, como células T CD4 + sendo CD25- e / ou FoxP3-) sobre células T reguladoras (por exemplo, Células CD4+ CD25+ FoxP3+).

[0043] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ estão em resíduos de aminoácidos de IL2 ou uma variante funcional desta que contata IL2R α . Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos

que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ reduzem a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$ em maior extensão do que para IL2R $\beta\gamma$.

[0044] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ compreendem substituições em uma ou mais posições de IL2 ou uma variante funcional desta selecionada a partir do grupo que consiste em K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, K64, P65, E68, L72 e Y107.

[0045] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ estão em uma ou mais posições de IL2 ou uma variante funcional da mesma tendo um resíduo de aminoácido ácido ou básico em IL2 humana de tipo selvagem que contata a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$, em que se o resíduo de aminoácido é um resíduo de aminoácido ácido (ácido glutâmico (Glu / E) ou ácido aspártico (Asp / D), em particular ácido glutâmico) na IL2 humana de tipo selvagem, a substituição é por um resíduo de aminoácido básico (lisina (Lys / K) ou arginina (Arg / R), em particular, lisina) e se o resíduo de aminoácido for um resíduo de aminoácido básico (lisina (Lys / K) ou arginina (Arg / R), em particular, lisina) na IL2 humana de tipo selvagem a substituição é por um resíduo de aminoácido ácido (ácido glutâmico (Glu / E) ou ácido aspártico (Asp / D), em particular ácido glutâmico). Em diferentes concretizações, a IL2 humana ou variante funcional da mesma é substituída em um ou mais, tal como dois ou mais ou três ou mais, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 tais posições tendo um ácido ou básico resíduo de

aminoácido na IL2 humana de tipo selvagem que contata a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$.

[0046] Em uma concretização, o resíduo de aminoácido ácido em IL2 humana de tipo selvagem contata um resíduo de aminoácido básico na subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$. Em uma concretização, o resíduo de aminoácido básico em IL2 humana de tipo selvagem contata um resíduo de aminoácido ácido em subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$.

[0047] Em uma concretização, a IL2 humana de tipo selvagem tem a sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 17.

[0048] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ compreendem uma substituição em pelo menos uma das posições 35 (lisina), 43 (lisina), 61 (ácido glutâmico) e 62 (ácido glutâmico ácido) em relação à IL2 humana de tipo selvagem e numerada de acordo com a IL2 humana de tipo selvagem.

[0049] Em diferentes concretizações, uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ estão em uma ou mais posições de IL2 ou uma variante funcional desta selecionada a partir do grupo que consiste em:

- posição 35,
- posição 43,
- posição 61,
- posição 62,
- posição 35 e posição 43,
- posição 35 e posição 61,

- posição 35 e posição 62,
- posição 43 e posição 61,
- posição 43 e posição 62,
- posição 61 e posição 62,
- posição 35, posição 43 e posição 61,
- posição 35, posição 43 e posição 62,
- posição 35, posição 61 e posição 62,
- posição 43, posição 61 e posição 62, ou
- posição 35, posição 43, posição 61 e posição 62.

[0050] Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina. Em uma concretização, a posição 62 é substituída por lisina.

[0051] Em uma concretização, a posição 35 é substituída. Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico.

[0052] Em uma concretização, a posição 43 é substituída. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico.

[0053] Em uma concretização, a posição 61 é substituída. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina.

[0054] Em uma concretização, a posição 62 é substituída. Em uma concretização, a posição 62 é substituída por lisina.

[0055] Em uma concretização, as posições 43 e 61 são substituídas. Em uma concretização, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída

por lisina.

[0056] Em uma concretização, as posições 35, 43 e 61 são substituídas. Em uma concretização, a posição 35 é substituída por ácido glutâmico, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída por lisina.

[0057] Em uma concretização, as posições 61 e 62 são substituídas. Em uma concretização, a posição 61 é substituída por lisina e a posição 62 é substituída por lisina.

[0058] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$ estão em resíduos de aminoácidos de IL2 que contatam IL2R β e/ou IL2R γ .

[0059] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R γ compreendem substituições em uma ou mais posições de IL2 selecionadas do grupo que consiste em K9, L12, Q13, E15, H16, D20, Q74, L80, R81, D84, L85, 186, N88, 192, L94 e E95.

[0060] Em uma concretização, uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$ compreendem uma substituição em pelo menos uma das posições 24, 65, 74, 80, 81, 85, 86, 89, 92 e 93 em relação ao selvagem tipo IL2 humano e numerado de acordo com IL2 humano tipo selvagem. O (s) resíduo (s) de aminoácido substituído (s) podem ser, mas não são necessariamente, substituições conservativas. Por exemplo, a mutação pode ser: I24V, P65H, Q74R, Q74H, Q74N, Q74S, L80F, L80V, R81 I, R81T, R81D, L85V, I86V, I89V, I92F, V93I.

[0061] Em uma concretização, a muteína IL2

compreende o seguinte conjunto de substituições de aminoácidos: 80F / 81D / 85V / 86V / 92F. A muteína IL2 pode ainda compreender a substituição de aminoácido 42A. A muteína IL2 pode compreender ainda uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: 24V, 65H, 74R, 74H, 74N, 74S, 89V, 93I.

[0062] Em algumas concretizações, a muteína IL2 compreende um conjunto de substituições de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em:

- (i) 74N, 80F, 81D, 85V, 86V, 89V, 92F;
- (ii) 74H, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (iii) 74S, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (iv) 74N, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (v) 80F, 81 D, 85V, 86V, 92F;
- (vi) 80F, 81 D, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I;
- (vii) 18R, 22E, 80F, 81D, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I, 126T;
- (viii) 18R, 22E, 74S, 80F, 81T, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I, 126T.

[0063] A muteína IL2 aqui descrita pode ser ligada a um grupo modificador farmacocinético e, assim, pode ser uma "IL2 farmacocinética estendida (PK)".

[0064] Em um aspecto, a invenção se refere a um polipeptídeo como aqui descrito, que é uma IL2 farmacocinética estendida (PK) compreendendo ainda uma sequência de aminoácidos que é heteróloga à IL2 ou variante funcional desta fundida à muteína IL2.

[0065] Em uma concretização, a sequência de aminoácidos que é heteróloga para a IL2 ou variante funcional

desta é selecionada do grupo que consiste em albumina sérica, um fragmento de imunoglobulina, transferrina e Fn3, ou variantes dos mesmos. Em uma concretização, a albumina sérica compreende albumina sérica de camundongo ou albumina sérica humana. Em uma concretização, o fragmento de imunoglobulina compreende um domínio Fc de imunoglobulina.

[0066] Em um aspecto, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 a 16, tal como SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 da listagem de sequência.

[0067] Os polipeptídeos descritos acima também são denominados "polipeptídeo variante de IL2" ou simplesmente "variante de IL2" neste relatório descritivo.

[0068] Em um aspecto, a invenção se refere a um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito. Em uma concretização, o polinucleotídeo é RNA.

[0069] Em um aspecto, a invenção se refere a uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito.

[0070] Em um aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito ou a célula hospedeira que compreende o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito.

[0071] Em um aspecto, a invenção se refere a um método de tratamento de um sujeito compreendendo a

administração ao sujeito do polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou a composição farmacêutica aqui descrita. Em uma concretização, o sujeito tem câncer.

[0072] Em uma concretização, o sujeito é tratado adicionalmente usando uma ou mais imunoterapias, por exemplo, usando vacinação ou transferência adotiva de células T, tais como vacinas de células T ou transferência adotiva de células T (naive ou receptor de células T transgênicas ou receptor de antígeno quimérico transgênico) células T ou células NK.

[0073] A eficácia das vacinas, em que o antígeno é entregue *per se* ou como um polinucleotídeo, em particular, como RNA que codifica o antígeno (por exemplo, RNA que codifica um peptídeo ou proteína usada para vacinação também referido como "peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir um a resposta imune contra um antígeno "aqui) pode ser aumentada pela coadministração de polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos, em que o polipeptídeo variante de IL2 é entregue *per se* ou como um polinucleotídeo, em particular RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2. A vacina é, particularmente, eficaz se o RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 for direcionado ao fígado para disponibilidade sistêmica. As células do fígado podem ser transfectadas com eficiência e são capazes de produzir grandes quantidades de proteínas. O mRNA que codifica o antígeno é, preferencialmente, direcionado para

órgãos linfoides secundários. Além disso, a vacina é, particularmente, eficaz se um inibidor do ponto de controle imunológico, como um anticorpo anti-PD-L1, for posteriormente administrado.

[0074] Em um aspecto, a invenção se refere a um método para induzir uma resposta imune em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito:

a. o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou a composição farmacêutica aqui descrita; e

b. um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína.

[0075] Em uma concretização, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína é RNA.

[0076] Em uma concretização, o método para induzir uma resposta imune em um sujeito compreende a administração ao sujeito:

a. RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito; e

b. RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito.

[0077] Em uma concretização, o polipeptídeo ativa preferencialmente células T efetoras (por exemplo, células T CD8+ e / ou células T CD4+, como células T CD4+ sendo CD25- e / ou FoxP3-) sobre células T reguladoras (por exemplo,

Células T CD4+ CD25+ FoxP3+).

[0078] Em uma concretização, o método é um método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, em que o antígeno é um antígeno associado a tumor.

[0079] Em um aspecto, a invenção se refere a um método para tratar ou prevenir o câncer em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito:

a. o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou a composição farmacêutica aqui descrita; e

b. um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno associado a tumor no sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína.

[0080] Em uma concretização, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína é RNA.

[0081] Em uma concretização, o método para tratar ou prevenir o câncer em um sujeito compreende a administração ao sujeito:

a. RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito; e

b. RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno associado a tumor no sujeito.

[0082] Em uma concretização, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de

próstata, câncer de ovário, câncer de cólon, mesotelioma, carcinoma de células renais e câncer cerebral.

[0083] Em uma concretização, os métodos descritos neste relatório descritivo compreendem ainda a administração ao sujeito de um inibidor do ponto de controle imunológico. Em uma concretização, o inibidor do ponto de verificação imunológico tem como alvo a interação entre (i) PD-1 e PD-L1, ou (ii) CTLA-4 e CD80 ou CD86. Em uma concretização, o inibidor do ponto de verificação imunológico é um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em uma concretização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo tem como alvo PD-1, PD-L1 ou CTLA-4.

[0084] Em uma concretização, o RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito e, opcionalmente, o inibidor do ponto de controle imunológico são administrados simultaneamente ou sequencialmente.

[0085] Em um aspecto, a invenção se refere a uma preparação médica que compreende:

a. o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou a composição farmacêutica aqui descrita.

[0086] Em uma concretização, a preparação médica compreende ainda:

b. um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno em um

sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína.

[0087] Em uma concretização, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína é RNA.

[0088] Em uma concretização, a preparação médica compreende:

a. RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito; e

b. RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno em um sujeito.

[0089] Em uma concretização da preparação médica, o RNA está presente em uma forma selecionada de uma forma líquida, uma forma sólida ou uma combinação das mesmas. Em uma concretização, a forma sólida é uma forma congelada ou uma forma desidratada. Em uma concretização, a forma desidratada é uma forma liofilizada ou seca por pulverização.

[0090] Em uma concretização, a preparação médica compreende ainda um inibidor de ponto de controle imunológico. Em uma concretização, o inibidor do ponto de verificação imunológico tem como alvo a interação entre (i) PD-1 e PD-L1, ou (ii) CTLA-4 e CD80 ou CD86. Em uma concretização, o inibidor do ponto de verificação imunológico é um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em uma concretização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo tem como alvo PD-1, PD-L1 ou CTLA-4.

[0091] Em uma concretização, a preparação médica é um kit. Em uma concretização, a preparação médica é uma composição farmacêutica.

[0092] Em uma concretização, a preparação médica compreende cada componente A. e B. em um recipiente separado.

[0093] Em uma concretização, a preparação médica é uma composição farmacêutica. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende ainda um ou mais veículos, diluentes e / ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[0094] Em uma concretização, a preparação médica compreende ainda instruções para o uso da preparação médica para o tratamento ou prevenção do câncer, em que o antígeno é um antígeno associado ao tumor.

[0095] Em um aspecto, a invenção se refere à preparação médica aqui descrita para uso farmacêutico.

[0096] Em uma concretização, o uso farmacêutico compreende um tratamento terapêutico ou profilático de uma doença ou distúrbio.

[0097] Em um aspecto, a invenção se refere à preparação médica aqui descrita para uso em um método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, em que o antígeno é um antígeno associado a tumor.

[0098] Em uma concretização, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de cólon, mesotelioma, carcinoma de células renais e câncer cerebral.

[0099] Em um outro aspecto, a invenção se refere ao polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2

aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou a composição farmacêutica aqui descrita para uso em um método de tratamento de um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito do polipeptídeo, o polinucleotídeo, a célula hospedeira ou a composição farmacêutica.

[00100] Em uma concretização, o sujeito tem câncer.

[00101] Em um aspecto adicional, a invenção se refere ao polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou o produto farmacêutico

[00102] composição aqui descrita para uso em um método para induzir uma resposta imune em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito:

a. o polipeptídeo, o polinucleotídeo, a célula hospedeira ou a composição farmacêutica; e

b. um peptídeo ou proteína compreendendo um epítipo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína.

[00103] Em uma concretização, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína é RNA.

[00104] Em uma concretização, o método para induzir uma resposta imune em um sujeito compreende a administração ao sujeito:

a. RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito; e

b. RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito.

[00105] Em uma concretização, o polipeptídeo ativa preferencialmente células T efetoras (por exemplo, células T CD8 + e / ou células T CD4 +, como células T CD4 + sendo CD25- e / ou FoxP3-) sobre células T reguladoras (por exemplo, CD4 + CD25 + FoxP3 + Células T).

[00106] Em uma concretização, o método é um método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, em que o antígeno é um antígeno associado a tumor.

[00107] Em um outro aspecto, a invenção se refere ao polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, a célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, ou a composição farmacêutica aqui descrita para uso em um método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito:

a. o polipeptídeo, o polinucleotídeo, a célula hospedeira ou a composição farmacêutica; e

b. um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno associado a tumor no sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína.

[00108] Em uma concretização, o polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou proteína é RNA.

[00109] Em uma concretização, o método para tratar ou prevenir o câncer em um sujeito compreende a administração

ao sujeito:

a. RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito; e

b. RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno associado a tumor no sujeito.

[00110] Em uma concretização, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de cólon, mesotelioma, carcinoma de células renais e câncer cerebral.

[00111] Em uma concretização, os métodos descritos neste relatório descritivo compreendem ainda a administração ao sujeito de um inibidor do ponto de controle imunológico. Em uma concretização, o inibidor do ponto de verificação imunológico tem como alvo a interação entre (i) PD-1 e PD-L1, ou (ii) CTLA-4 e CD80 ou CD86. Em uma concretização, o inibidor do ponto de verificação imunológico é um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em uma concretização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo tem como alvo PD-1, PD-L1 ou CTLA-4.

[00112] Em uma concretização, o RNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito e, opcionalmente, o inibidor do ponto de controle imunológico são administrados simultaneamente ou sequencialmente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00113] A Figura 1 mostra a expressão *in vitro* e

ligação IL2R $\beta\gamma$ de variantes de IL2 codificadas por RNA. $1,2 \times 10^6$ células HEK293T / 17 foram semeadas em placas de 6 poços e depois de atingir aprox. 80% de confluência lipofected com 3 μg de mRNA (400 μg de mRNA complexado por μL de Lipofectamine MessengerMAX) em um volume total de 3,25 mL DMEM + 10% FBS. Após 20 h de incubação a 37° C, 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e suas diluições em série incubadas com o receptor IL2 de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) que expressa a linhagem celular humana TF-1_IL2R $\beta\gamma$. As respostas de proliferação foram medidas após três dias quantificando as células viáveis através da quantidade de ATP usando o ensaio CellTiter-Glo® 2.0. Os dados mostrados são média $\pm$ desvio padrão (SD) de n = 2 repetições técnicas. RLU = unidades de luminescência relativa.

[00114] A Figura 2 mostra a ligação de CD25 de variantes de IL2 mutCD25. 100 ng de CD25 (A) humano recombinante ligado à placa ou CD25 (B) de camundongo foram incubados com sobrenadantes contendo variante de IL2 diluída 1:2 da lipofecção de HEK293T / 17 e a proteína ligada foi detectada por meio de uma albumina de soro anti-humana conjugada com HRP anticorpo. Os sobrenadantes de células HEK293T / 17 lipofetadas com mRNA que codifica para hAlb apenas foram usados como controle negativo. Os dados apresentados são a média $\pm$ DP de n = 2 réplicas técnicas.

[00115] A Figura 3 mostra a bioatividade de variantes de IL2 mutCD25 em cultura de células dependentes do receptor de IL2 de alta afinidade (IL2R $\alpha\beta\gamma$). As respostas de proliferação da linhagem de células T CTLL-2 de camundongo

CD25high são mostradas. As células foram incubadas durante três dias com uma diluição em série de sobrenadantes contendo a variante de IL2 e a proliferação foi medida quantificando as células viáveis através da quantidade de ATP usando o Ensaio CellTiter-Glo® 2.0. Os dados mostrados são a média $\pm$ DP de $n = 2-3$ réplicas técnicas equipadas com um ajuste logarítmico de quatro parâmetros para calcular os valores de EC50. RLU = unidades de luminescência relativa.

[00116] A Figura 4 mostra a bioatividade de variantes de IL2 em diferentes subconjuntos de células T em PBMCs humanos medidos pelo aumento da proliferação inespecífica de antígeno mediado por IL2. PBMCs marcados com CFSE foram incubados com uma concentração sub-ótima de anticorpo anti-CD3 (clone UCHT1) e diluições em série de sobrenadantes contendo variantes de IL2 por quatro dias. A proliferação de células T CD4 + (A e D), células T CD8 + (B e E) e células NK CD56 + (C e F) foi medida por citometria de fluxo. Os dados são mostrados de um doador representativo como valores médios do índice de expansão, conforme calculado usando o software FlowJo v10.4 e ajustado com um ajuste logarítmico de quatro parâmetros. Barras de erro (SD) indicam a variação dentro do experimento (três repetições, usando células de um doador).

[00117] A Figura 5 mostra a bioatividade relativa de diferentes variantes de IL2 em cultura de células dependentes de receptor de IL2 de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) versus receptor de IL2 de alta afinidade (IL2R $\alpha\beta\gamma$). As respostas de proliferação de (AB) o receptor IL2 de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) que expressa a linhagem celular TF-

1_IL2R $\beta\gamma$ e (C-D) o receptor IL2 de alta afinidade (IL2R $\alpha\beta\gamma$) que expressa a linhagem de células T de camundongo CTLL-2 são mostrando. As culturas de células foram incubadas durante três dias com uma diluição em série do sobrenadante contendo a variante de IL2 e a proliferação foi medida quantificando as células viáveis através da quantidade de ATP usando o ensaio CellTiter-Glo® 2.0. Os dados mostrados são a média $\pm$ DP de n = 2-3 réplicas técnicas equipadas com um ajuste logarítmico de quatro parâmetros para calcular os valores de EC₅₀. RLU = unidades de luminescência relativa

[00118] A Figura 6 mostra as propriedades funcionais de variantes de IL2 em diferentes subconjuntos de células T em PBMCs humanos medidos por fosforilação mediada por IL2 de STAT5. Curvas de dose-resposta de fosforilação de STAT5 (pSTAT5) em células T regulatórias CD4 + CD25 + FoxP3 + (A), células T efectoras CD4 + CD25- e de memória (B), bem como células T citotóxicas CD8 + (C). PBMCs foram incubados com diluições em série do sobrenadante contendo a variante de IL2 e a fosforilação de STAT5 foi subsequentemente analisada em diferentes subconjuntos de células T por meio de citometria de fluxo. Os dados apresentados são a média $\pm$ DP de n = 2 réplicas técnicas equipadas com um ajuste logarítmico de quatro parâmetros para calcular os valores de EC₅₀.

[00119] A Figura 7 mostra os efeitos de variantes IL2 mutCD25 na vacinação de células T *in vivo* - A, camundongos BALB / c (n = 5 por grupo) foram vacinados por via intravenosa (iv) com 20 g de RNA-LPX que codifica o CD8 +Antígeno de célula T gp70. Três dias após a vacinação, hAlb (controle

negativo) ou doses crescentes de hAlb-hlL2, hAlb-hlL2_A4, hAlb-hlL2_A6 RNA formulado como nanopartículas lipídicas (LNPs) foram administradas iv. Peso do fígado (B); Atividade de Aspartat-Aminotransferase (ASAT) em soros (C); células CD8 positivas (D), CD8 positivas (E), CD45 positivas (F) ou CD4 FoxP3 CD25 positivas (G) específicas por ml de sangue; bem como a razão de células T CD8 para Treg (H) é mostrada. Os pontos representam ratos individuais, as linhas representam a média do grupo. I, a mudança de dobra de células T positivas para CD8 específicas para gp70 ou não específicas sobre os respectivos valores médios de controle de hAlb de camundongos tratados (média + erro padrão da média (SEM)). A significância estatística foi determinada usando ANOVA e Dunnett 'de uma via s teste de comparações múltiplas (BH) ou uma ANOVA de dois fatores seguida pelo teste de comparação múltipla de Sidak (I). Todas as análises foram bicaudais e realizadas usando GraphPad Prism 6. ns: $P > 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

[00120] A Figura 8 mostra a eficácia melhorada de variantes IL2 mutCD25 por adição de mutações mut $\beta\gamma$. Camundongos BALB / c (n = 5 por grupo) foram vacinados por via intravenosa (iv) com 20 g de RNA-LPX que codifica o CD8 +Antígeno de célula T gp70. Três dias após a vacinação, hAlb (controle negativo) ou diferentes doses de hAlb-hlL2_A4, hAlb-hlL2_A4s, hlL2_A6-hAlb e hAlb-hlL2_A6s RNA formulado como LNPs foram administrados iv. É mostrada a frequência de células NK positivas para CD8 (A), CD4 FoxP3 CD25 positivas (B) e CD4 CD8 negativas para CD49b (D). Os pontos representam ratos individuais, as linhas representam

a média do grupo. C, A variação de vezes de células T positivas para CD8 específicas ou não específicas para gp70 sobre os respectivos valores médios de controle de hAlb de camundongos tratados é representada (média + DP). A significância estatística foi determinada usando ANOVA de uma via e teste de comparações múltiplas de Dunnett (A, B, D) ou uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Sidak (C). Todas as análises foram bicaudais e realizadas usando GraphPad Prism 6. ns: $P > 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

[00121] A Figura 9 mostra as variantes de IL2 com mutações mutCD25 e mut $\beta\gamma$ combinadas são superiores a IL2 de tipo selvagem e a variante de IL2 mut $\beta\gamma$. Camundongos BALB / c (n = 5 por grupo) foram vacinados iv com 20 μg de gp70 RNA-LPX nos dias 0 e 7, bem como RNA-LNPs de citocina (dose indicada na figura) nos dias 3 e 10. Análise de linfócitos sanguíneos via citometria de fluxo (ver Exemplo 8) foi realizada no dia 7 e 14 (A). B, números de células T positivas para CD8 específicas do antígeno gp70 por mI de sangue (média $\pm$ SEM). C, Tregs CD4 CD25 FoxP3 positivas por mI de sangue (mean $\pm$ SEM). D, números de células T positivas para CD8 por mI de sangue (média $\pm$ DP). A razão de células T específicas do antígeno (E) ou células T CD8 + (F) para Tregs é representada (média $\pm$ SEM). G, a mudança de dobra de células T positivas para CD8 específicas ou não específicas de gp70 em relação aos respectivos valores médios de controle de hAlb de camundongos tratados (média + SEM). H, é mostrada a fração média ($\pm$ SEM) de células T CD8 positivas para o Tetrâmero KLRG1 CD127 negativas. EU, Número de células NK

positivas para CD49 CD4 CD8 negativas por mI de sangue (média $\pm$ DP). H, é mostrada a fração de células NK positivas para KLRG1 por camundongo (a linha representa a média do grupo). A significância estatística foi determinada usando ANOVA de duas vias e teste de comparações múltiplas de Dunnett (BF, H, i) ou teste de Sidak (G) ou uma ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey (J). Todas as análises foram bicaudais e realizadas usando GraphPad Prism 6. ns: $P > 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

[00122] A Figura 10 mostra a administração de variantes de IL2 com mutações mutCD25 e mut $\beta\gamma$ combinadas aumenta as respostas de células T CD4+. Camundongos C57BL / 6 (n = 7 por grupo) foram tratados iv com 20 μ g de B16_M30 (Kreiter, S. et al. Nature 520, 692-696 (2015)) RNA-LPX e 3 mg de hAlb, hAlb-hlL2 ou hAlb- RNA-LNPs de hlL2_A4s nos dias 0, 7 e 14. Os linfócitos sanguíneos foram analisados por meio de citometria de fluxo no dia 19 (A). B16_M30 é um neoepítipo restrito ao MHC de classe II da linha de células tumorais B16F10 reconhecida por células T CD4 + (Kreiter, S. et al. Nature 520 692-696 (2015)). Apenas a co-administração de hAlb-hlL2_A4s, mas não de hAlb-hlL2, aumentou o número de células T efetoras CD4 + / não Tregs (CD25- FoxP3- CD4 +) e células T específicas de tetrâmero + CD4 + B16_M30, respectivamente (B, C).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00123] Embora a presente divulgação seja descrita em detalhes abaixo, deve ser entendido que esta divulgação não está limitada às metodologias, protocolos e reagentes específicos descritos neste relatório descritivo, pois estes

podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada neste relatório descritivo tem a finalidade de descrever concretizações particulares apenas e não se destina a limitar o escopo da presente divulgação, que será limitado apenas pelas reivindicações anexas. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste relatório descritivo têm os mesmos significados como comumente entendidos por um técnico versado no assunto.

[00124] De preferência, os termos usados neste relatório descritivo são definidos conforme descrito em "Um glossário multilíngue de termos biotecnológicos: (Recomendações IUPAC)", HGW Leuenberger, B. Nagel e H. Kolbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suíça, (1995).

[00125] A prática da presente divulgação empregará, salvo indicação em contrário, métodos convencionais de química, bioquímica, biologia celular, imunologia e técnicas de DNA recombinante que são explicadas na literatura na área (cf., por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição, J. Sambrook et al eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

[00126] A seguir, os elementos da presente divulgação serão descritos. Esses elementos são listados com concretizações específicas, no entanto, deve ser entendido que eles podem ser combinados de qualquer maneira e em qualquer número para criar concretizações adicionais. Os exemplos e concretizações descritos de várias maneiras não devem ser interpretados para limitar a presente divulgação apenas às concretizações explicitamente descritas. Esta

descrição deve ser entendida para divulgar e abranger concretizações que combinam as concretizações explicitamente descritas com qualquer número dos elementos divulgados. Além disso, quaisquer permutações e combinações de todos os elementos descritos devem ser consideradas divulgadas por esta descrição, a menos que o contexto indique o contrário.

[00127] O termo "cerca de" significa aproximadamente ou quase, e no contexto de um valor numérico ou intervalo estabelecido neste relatório descritivo em uma concretização significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ ou $\pm 3\%$ do valor numérico ou intervalo recitado ou reivindicado.

[00128] Os termos "um" e "uma" e "o / a" e referências semelhantes usadas no contexto da descrição da divulgação (especialmente no contexto das reivindicações) devem ser interpretados para abranger tanto o singular quanto o plural, a menos que indicado de outra forma neste relatório descritivo ou claramente contradito pelo contexto. A recitação de intervalos de valores neste relatório descritivo se destina meramente a servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado dentro do intervalo. A menos que indicado de outra forma neste relatório descritivo, cada valor individual é incorporado no relatório descritivo como se fosse individualmente citado neste relatório descritivo. Todos os métodos descritos neste relatório descritivo podem ser realizados em qualquer ordem adequada, a menos que indicado de outra forma aqui ou claramente contradito pelo contexto. O uso de todo e qualquer exemplo ou linguagem exemplar (por exemplo, "como"), fornecido neste relatório descritivo se

destina apenas a ilustrar melhor a divulgação e não representa uma limitação no escopo das reivindicações. Nenhuma linguagem na especificação deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado essencial para a prática da divulgação.

[00129] A menos que expressamente especificado de outra forma, o termo "compreendendo" é usado no contexto do presente documento para indicar que outros membros podem opcionalmente estar presentes além dos membros da lista introduzida por "compreendendo". É, no entanto, contemplado como uma concretização específica da presente divulgação que o termo "compreendendo" abrange a possibilidade de nenhum outro membro estar presente, ou seja, para o propósito desta concretização "compreendendo" deve ser entendido como tendo o significado de "consiste em".

[00130] Vários documentos são citados ao longo do texto deste relatório descritivo. Cada um dos documentos citados neste relatório descritivo (incluindo todas as patentes, pedidos de patentes, publicações científicas, especificações do fabricante, instruções, etc.), sejam *supra* ou *infra*, são aqui incorporados por referência em sua totalidade. Nada neste relatório descritivo deve ser interpretado como uma admissão de que a presente divulgação não tinha o direito de anteceder tal divulgação.

[00131] A seguir, serão fornecidas definições que se aplicam a todos os aspectos da presente divulgação. Os termos a seguir têm os seguintes significados, a menos que indicado de outra forma. Quaisquer termos indefinidos têm seus significados reconhecidos no estado da técnica.

Definições

[00132] "Reduzir", "diminuir" ou "inibir", como aqui utilizado, significa uma diminuição geral ou a capacidade de causar uma diminuição geral, de preferência de 5% ou mais, 10% ou mais, 20% ou mais, mais preferencialmente de 50% ou superior, e, mais preferencialmente, de 75% ou superior, no nível, por exemplo, no nível de ligação.

[00133] Termos como "aumentar" ou "melhorar", preferencialmente, se referem a um aumento ou melhoria de cerca de pelo menos 10%, de preferência, pelo menos 20%, de preferência pelo menos 30%, mais preferencialmente, pelo menos 40%, mais preferencialmente, pelo menos 50%, ainda mais preferencialmente pelo menos 80%, e, mais preferencialmente, pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 500% ou ainda mais.

[00134] De acordo com a divulgação, o termo "peptídeo" compreende oligo- e polipeptídeos e se refere a substâncias que compreendem cerca de dois ou mais, cerca de 3 ou mais, cerca de 4 ou mais, cerca de 6 ou mais, cerca de 8 ou mais, cerca de 10 ou mais, cerca de 13 ou mais, cerca de 16 ou mais, cerca de 20 ou mais e até cerca de 50, cerca de 100 ou cerca de 150 aminoácidos consecutivos ligados uns aos outros por meio de ligações peptídicas. O termo "proteína" ou "polipeptídeo" se refere a peptídeos grandes, em particular, peptídeos possuindo pelo menos cerca de 50 aminoácidos, mas os termos "peptídeo", "proteína" e "polipeptídeo" são aqui usados normalmente como sinónimos.

[00135] Uma "proteína terapêutica" tem um efeito positivo ou vantajoso sobre uma condição ou estado de doença

de um sujeito quando fornecida ao sujeito em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em uma concretização, uma proteína terapêutica tem propriedades curativas ou paliativas e pode ser administrada para melhorar, aliviar, aliviar, reverter, atrasar o início ou diminuir a gravidade de um ou mais sintomas de uma doença ou distúrbio. Uma proteína terapêutica pode ter propriedades profiláticas e pode ser usada para atrasar o início de uma doença ou para diminuir a gravidade de tal doença ou condição patológica. O termo "proteína terapêutica" inclui proteínas ou peptídeos inteiros e também pode se referir a fragmentos terapeuticamente ativos dos mesmos. Também pode incluir variantes terapeuticamente ativas de uma proteína. Exemplos de proteínas terapeuticamente ativas incluem,

[00136] "Fragmento", com referência a uma sequência de aminoácidos (peptídeo ou proteína), se refere a uma parte de uma sequência de aminoácidos, isto é, uma sequência que representa a sequência de aminoácidos encurtada no terminal N e / ou terminal C. Um fragmento encurtado no terminal C (fragmento N-terminal) pode ser obtido, por exemplo, por tradução de um quadro de leitura aberto truncado que não possui a extremidade 3' do quadro de leitura aberto. Um fragmento encurtado no terminal N (fragmento C-terminal) pode ser obtido, por exemplo, por tradução de um quadro de leitura aberto truncado que não tem a extremidade 5' do quadro de leitura aberto, desde que o quadro de leitura aberto truncado compreenda um códon inicial que serve para iniciar a tradução. Um fragmento de uma sequência de aminoácidos compreende, por exemplo, pelo menos 50%, pelo

menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% dos resíduos de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos. Um fragmento de uma sequência de aminoácidos preferencialmente compreende pelo menos 6, em particular pelo menos 8, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 50, ou pelo menos 100 aminoácidos consecutivos de uma sequência de aminoácidos.

[00137] Por "variante" ou "proteína variante" ou "polipeptídeo variante" aqui entende-se uma proteína que difere de uma proteína de tipo selvagem em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. O polipeptídeo parental pode ser um polipeptídeo de ocorrência natural ou de tipo selvagem (WT), ou pode ser uma versão modificada de um polipeptídeo de tipo selvagem. De preferência, o polipeptídeo variante tem pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação com o polipeptídeo parental, por exemplo, de 1 a cerca de 20 modificações de aminoácidos e, de preferência, de 1 a cerca de 10 ou de 1 a cerca de 5 modificações de aminoácidos em comparação com o parental.

[00138] Por "polipeptídeo parental", "proteína parental", "polipeptídeo precursor" ou "proteína precursora" como aqui utilizado, entende-se um polipeptídeo não modificado que é subsequentemente modificado para gerar uma variante. Um polipeptídeo parental pode ser um polipeptídeo de tipo selvagem, ou uma variante ou versão projetada de um polipeptídeo de tipo selvagem.

[00139] Por "tipo selvagem" ou "WT" ou "nativo" aqui entende-se uma sequência de aminoácidos que é encontrada na natureza, incluindo variações alélicas. Uma proteína ou

polipeptídeo de tipo selvagem possui uma sequência de aminoácidos que não foi intencionalmente modificada.

[00140] Para os fins da presente divulgação, "variantes" de uma sequência de aminoácidos (peptídeo, proteína ou polipeptídeo) compreendem variantes de inserção de aminoácidos, variantes de adição de aminoácidos, variantes de deleção de aminoácidos e / ou variantes de substituição de aminoácidos. O termo "variante" inclui todas as variantes de processamento, variantes modificadas pós-tradução, conformações, isoformas e homólogos de espécies, em particular aqueles que são naturalmente expressos por células.

[00141] Variantes de inserção de aminoácidos compreendem inserções de um ou dois ou mais aminoácidos em uma sequência de aminoácidos particular. No caso de variantes de sequência de aminoácidos tendo uma inserção, um ou mais resíduos de aminoácidos são inseridos em um local particular em uma sequência de aminoácidos, embora a inserção aleatória com rastreamento apropriado do produto resultante também seja possível. As variantes de adição de aminoácidos compreendem fusões de terminal amino e / ou carboxi de um ou mais aminoácidos, como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos. Variantes de deleção de aminoácidos são caracterizadas pela remoção de um ou mais aminoácidos da sequência, como por remoção de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos. As deleções podem estar em qualquer posição da proteína. Variantes de deleção de aminoácidos que compreendem a deleção na extremidade N-terminal e / ou C-terminal da proteína são também chamadas de variantes de

truncamento N-terminal e / ou C-terminal. As variantes de substituição de aminoácidos são caracterizadas por pelo menos um resíduo na sequência ser removido e outro resíduo inserido em seu lugar. É dada preferência às modificações em posições na sequência de aminoácidos que não são conservadas entre proteínas ou peptídeos homólogos e / ou para substituir os aminoácidos por outros com propriedades semelhantes. De preferência, as alterações de aminoácidos em variantes de peptídeos e proteínas são alterações conservativas de aminoácidos, isto é, substituições de aminoácidos com carga semelhante ou sem carga. Uma mudança conservadora de aminoácidos envolve a substituição de um de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Os aminoácidos de ocorrência natural são geralmente divididos em quatro famílias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), não polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano) e sem carga aminoácidos polares (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptofano e tirosina são às vezes classificados em conjunto como aminoácidos aromáticos. Em uma concretização, as substituições conservadoras de aminoácidos incluem substituições dentro dos seguintes grupos: Fenilalanina, triptofano e tirosina são às vezes classificados em conjunto como aminoácidos aromáticos. Em uma concretização, as substituições conservadoras de aminoácidos incluem substituições dentro dos seguintes grupos: Fenilalanina, triptofano e tirosina são às vezes classificados em conjunto como aminoácidos

aromáticos. Em uma concretização, as substituições conservadoras de aminoácidos incluem substituições dentro dos seguintes grupos:

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

[00142] De preferência, o grau de similaridade, de preferência a identidade entre uma determinada sequência de aminoácidos e uma sequência de aminoácidos que é uma variante da referida sequência de aminoácidos será de pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82 %, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. O grau de semelhança ou identidade é dado preferencialmente para uma região de aminoácido que é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% de todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência. Por exemplo, se a sequência de aminoácidos de referência consiste em 200 aminoácidos, o grau de semelhança ou identidade é dado preferencialmente por pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 60, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos cerca de 160,

pelo menos cerca de 180 ou cerca de 200 aminoácidos, de preferência aminoácidos contínuos. Em concretizações preferidas, o grau de similaridade ou identidade é dado para todo o comprimento da sequência de aminoácidos de referência. O alinhamento para determinar a similaridade de sequência, de preferência a identidade de sequência, pode ser feito com ferramentas conhecidas no estado da técnica, de preferência, usando o melhor alinhamento de sequência, por exemplo, usando Align, usando configurações padrão, de preferência EMBOSS:: agulha, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Estenda 0,5.

[00143] "Similaridade de sequência" indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos ou que representam substituições conservativas de aminoácidos. "Identidade de sequência" entre duas sequências de aminoácidos indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos entre as sequências.

[00144] O termo "porcentagem de identidade" destina-se a denotar uma porcentagem de resíduos de aminoácidos que são idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtida após o melhor alinhamento, esta porcentagem sendo puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente e ao longo todo o seu comprimento. As comparações de sequências entre duas sequências de aminoácidos são convencionalmente realizadas comparando estas sequências depois de as terem alinhado de forma ótima, sendo a referida comparação efetuada por segmento ou por "janela de comparação" de modo a identificar e comparar regiões locais de semelhança de sequência. O

alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser produzido, além de manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, 1981, *Adv. App. Matemática*. 2, 482, por meio do algoritmo de homologia local de Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol Biol.* 48, 443, por meio do método de pesquisa de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, ou por meio de programas de computador que usam esses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

[00145] A percentagem de identidade é calculada determinando o número de posições idênticas entre as duas sequências comparadas, dividindo este número pelo número de posições comparadas e multiplicando o resultado obtido por 100 de modo a obter a percentagem de identidade entre estas duas sequências.

[00146] As sequências de aminoácidos homólogas exibem de acordo com a divulgação pelo menos 40%, em particular pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% e de preferência pelo menos 95%, pelo menos 98 ou pelo menos 99% de identidade dos resíduos de aminoácidos.

[00147] As variantes da sequência de aminoácidos aqui descritas podem ser prontamente preparadas pelo especialista, por exemplo, por manipulação de DNA recombinante. A manipulação de sequências de DNA para preparar peptídeos ou proteínas com substituições, adições, inserções ou deleções, é descrito em detalhe em Sambrook et

al. (1989), por exemplo. Além disso, os peptídeos e variantes de aminoácidos aqui descritos podem ser facilmente preparados com o auxílio de técnicas de síntese de peptídeos conhecidas, tais como, por exemplo, por síntese em fase sólida e métodos semelhantes.

[00148] Em uma concretização, um fragmento ou variante de uma sequência de aminoácidos (peptídeo ou proteína) é de preferência um "fragmento funcional" ou "variante funcional". O termo "fragmento funcional" ou "variante funcional" de uma sequência de aminoácidos se refere a qualquer fragmento ou variante exibindo uma ou mais propriedades funcionais idênticas ou semelhantes àquelas da sequência de aminoácidos da qual é derivado, ou seja, é funcionalmente equivalente. No que diz respeito às citocinas, uma função particular é uma ou mais atividades imunomoduladoras exibidas pela sequência de aminoácidos a partir da qual o fragmento ou variante é derivado e / ou ligando ao (s) receptor (es) a sequência de aminoácidos a partir da qual o fragmento ou variante é derivado liga-se a.

[00149] Uma sequência de aminoácidos (peptídeo, proteína ou polipeptídeo) "derivada de" uma sequência de aminoácidos designada (peptídeo, proteína ou polipeptídeo) se refere à origem da primeira sequência de aminoácidos. De preferência, a sequência de aminoácidos que é derivada de uma sequência de aminoácidos particular tem uma sequência de aminoácidos que é idêntica, essencialmente idêntica ou homóloga a essa sequência particular ou a um fragmento desta. As sequências de aminoácidos derivadas de uma sequência de aminoácidos particular podem ser variantes

dessa sequência particular ou um fragmento desta.

[00150] O termo "polinucleotídeo" é aqui utilizado para ser interpretado de forma ampla e inclui DNA e RNA, incluindo DNA e RNA modificados.

[00151] Na presente divulgação, o termo "RNA" refere-se a uma molécula de ácido nucleico que inclui resíduos de ribonucleotídeo. Em modalidades preferidas, o RNA contém todos ou a maioria dos resíduos de ribonucleotídeo. Como usado aqui, "ribonucleotídeo" refere-se a um nucleotídeo com um grupo hidroxila na posição 2' de um grupo β -D-ribofuranosil. O RNA abrange, sem limitação, RNA de fita dupla, RNA de fita simples, RNA isolado, como RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético, RNA produzido de forma recombinante, bem como RNA modificado que difere do RNA de ocorrência natural pela adição, deleção, substituição e / ou alteração de um ou mais nucleotídeos. Tais alterações podem referir-se à adição de material não nucleotídico a nucleotídeos de RNA internos ou à (s) extremidade (s) do RNA. Também está contemplado aqui que os nucleotídeos no RNA podem ser nucleotídeos não padrão, tais como nucleotídeos sintetizados quimicamente ou desoxinucleotídeos. Para a presente divulgação, esses RNAs alterados são considerados análogos de RNA de ocorrência natural.

[00152] Em certas concretizações da presente divulgação, o RNA é RNA mensageiro (mRNA) que se refere a um transcrito de RNA que codifica um peptídeo ou proteína. Conforme estabelecido na técnica, o mRNA geralmente contém uma região 5' não traduzida (5'-UTR), uma

região de codificação de peptídeo e uma região 3' não traduzida (3'-UTR). Em algumas concretizações, o RNA é produzido por transcrição *in vitro* ou síntese química. Em uma concretização, o mRNA é produzido por transcrição *in vitro* usando um molde de DNA, onde DNA se refere a um ácido nucleico que contém desoxirribonucleotídeos.

[00153] Em uma concretização, o RNA é RNA transcrito *in vitro* (IVT-RNA) e pode ser obtido por transcrição *in vitro* de um molde de DNA apropriado. O promotor para controlar a transcrição pode ser qualquer promotor para qualquer RNA polimerase. Um molde de DNA para a transcrição *in vitro* pode ser obtido por clonagem de um ácido nucleico, em particular cDNA, e introduzindo-o em um vetor apropriado para a transcrição *in vitro*. O cDNA pode ser obtido por transcrição reversa de RNA.

[00154] Em uma concretização, o RNA pode ter ribonucleotídeos modificados. Exemplos de ribonucleotídeos modificados incluem, sem limitação, 5-metilcitidina, pseudouridina e / ou 1 -metil-pseudouridina.

[00155] Em algumas concretizações, o RNA, de acordo com a presente divulgação, compreende um cap 5'. Em uma concretização, o RNA da presente divulgação não tem 5'-trifosfatos não tampados. Em uma concretização, o RNA pode ser modificado por um análogo 5'-cap. O termo "5'-cap" se refere a uma estrutura encontrada na extremidade 5' de uma molécula de mRNA e geralmente consiste em um nucleotídeo de guanossina conectado ao mRNA por meio de uma ligação trifosfato 5' a 5'. Em uma concretização, esta guanossina é metilada na posição 7. O fornecimento de um RNA com um 5'-

cap ou análogo 5'-cap pode ser obtido por transcrição in vitro, em que o 5'-cap é co-transcricionalmente expresso na fita de RNA, ou pode ser anexado ao RNA pós-transcricionalmente usando enzimas de limitação.

[00156] Em algumas concretizações, o RNA, de acordo com a presente divulgação, compreende uma 5'-UTR e / ou uma 3'-UTR. O termo "região não traduzida" ou "UTR" se refere a uma região em uma molécula de DNA que é transcrita, mas não é traduzida em uma sequência de aminoácidos, ou à região correspondente em uma molécula de RNA, tal como uma molécula de mRNA. Uma região não traduzida (UTR) pode estar presente 5' (a montante) de um quadro de leitura aberto (5'-UTR) e / ou 3' (a jusante) de um quadro de leitura aberto (3'-UTR). Um 5'-UTR, se presente, é localizado na extremidade 5', a montante do códon de início de uma região de codificação de proteína. Uma 5-UTR está a jusante da tampa 5' (se houver), por exemplo, diretamente adjacente à tampa 5'. Uma 3'-UTR, se presente, está localizada na extremidade 3', a jusante do códon de terminação de uma região de codificação de proteína, mas o termo "3'-UTR" preferencialmente não inclui a cauda poli (A). Assim, a 3'-UTR está a montante da sequência poli (A) (se presente), por exemplo, diretamente adjacente à sequência poli (A).

[00157] Em algumas concretizações, o RNA, de acordo com a presente divulgação, compreende uma sequência 3'-poli (A). O termo "sequência poli (A)" se refere a uma sequência de resíduos adenil (A) que está tipicamente localizada na extremidade 3' de uma molécula de RNA. De acordo com a divulgação, em uma concretização, uma sequência de poli (A)

compreende pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 80, ou pelo menos cerca de 100, e até cerca de 500, até cerca de 400, até cerca de 300, até cerca de 200 ou até cerca de 150 nucleotídeos A. e, em particular, cerca de 120 nucleotídeos A.

[00158] No contexto da presente divulgação, o termo "transcrição" se refere a um processo, em que o código genético em uma sequência de DNA é transcrito em RNA. Posteriormente, o RNA pode ser traduzido em peptídeo ou proteína.

[00159] Com relação ao RNA, o termo "expressão" ou "tradução" se refere ao processo nos ribossomos de uma célula pelo qual uma fita de mRNA direciona a montagem de uma sequência de aminoácidos para formar um peptídeo ou proteína.

[00160] De acordo com a divulgação, o termo "RNA codifica" significa que o RNA, se presente no ambiente apropriado, tal como dentro de células de um tecido alvo, pode direcionar a montagem de aminoácidos para produzir o peptídeo ou proteína que codifica durante o processo de tradução. Em uma concretização, o RNA é capaz de interagir com a maquinaria de tradução celular, permitindo a tradução do peptídeo ou proteína. Uma célula pode produzir o peptídeo ou proteína codificada intracelularmente (por exemplo, no citoplasma e / ou no núcleo), pode secretar o peptídeo ou proteína codificada, ou pode produzi-lo na superfície.

[00161] Conforme usado neste relatório descritivo, os termos "ligado", "fundido" ou "fusão" são usados indistintamente. Esses termos se referem à união de dois ou mais elementos ou componentes ou domínios.

[00162] Tal como aqui utilizado, "meia-vida" se refere ao tempo gasto para a concentração de soro ou plasma de um composto, como um peptídeo ou proteína, reduzir em 50%, *in vivo*, por exemplo, devido à degradação e / ou eliminação ou sequestro por mecanismos naturais. Uma interleucina de PK estendida (IL) adequada para uso aqui é estabilizada *in vivo* e sua meia-vida aumentada por, por exemplo, fusão com albumina sérica (por exemplo, HSA ou MSA), que resistem à degradação e / ou eliminação ou sequestro. A meia-vida pode ser determinada de qualquer maneira conhecida per se, como por análise farmacocinética. As técnicas adequadas serão claras para o especialista na técnica e podem, por exemplo, geralmente envolver as etapas de administração adequada de uma dose adequada da sequência de aminoácidos ou composto a um sujeito; recolher amostras de sangue ou outras amostras do referido sujeito em intervalos regulares; determinar o nível ou concentração da sequência de aminoácidos ou composto na referida amostra de sangue; e calcular, a partir de (um gráfico dos) dados, assim, obtidos, o tempo até o nível ou concentração da sequência de aminoácidos ou composto ter sido reduzido em 50% em comparação com o nível inicial após a dosagem. Mais detalhes são fornecidos em, por exemplo, manuais padrão, tais como Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* e em Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Também é feita referência a Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

[00163] As citocinas são uma categoria de pequenas

proteínas (-5-20 kDa) que são importantes na sinalização celular. Sua liberação afeta o comportamento das células ao seu redor. As citocinas estão envolvidas na sinalização autócrina, sinalização parácrina e sinalização endócrina como agentes imunomoduladores. As citocinas incluem quimiocinas, interferons, interleucinas, linfocinas e fatores de necrose tumoral, mas geralmente não hormônios ou fatores de crescimento (apesar de alguma sobreposição na terminologia). As citocinas são produzidas por uma ampla gama de células, incluindo células imunes como macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e mastócitos, bem como células endoteliais, fibroblastos e várias células do estroma. Uma determinada citocina pode ser produzida por mais de um tipo de célula. As citocinas agem por meio de receptores e são especialmente importantes no sistema imunológico; as citocinas modulam o equilíbrio entre as respostas imunes humorais e celulares e regulam a maturação, o crescimento e a capacidade de resposta de determinadas populações de células. Algumas citocinas aumentam ou inibem a ação de outras citocinas de maneiras complexas.

[00164] A interleucina-2 (IL2) é uma citocina que induz a proliferação de células T ativadas por antígeno e estimula as células natural killer (NK). A atividade biológica de IL2 é mediada por um complexo de receptor de IL2 de múltiplas subunidades (IL2R) de três subunidades polipeptídicas que abrangem a membrana celular: p55 (IL2Ra, a subunidade alfa, também conhecida como CD25 em humanos), p75 (IL2R, a beta subunidade, também conhecida como CD122 em humanos) e p64 (IL2Ry, a subunidade gama, também conhecida

como CD132 em humanos). A resposta das células T à IL2 depende de uma variedade de fatores, incluindo: (1) a concentração de IL2; (2) o número de moléculas IL2R na superfície celular; e (3) o número de IL2R ocupado por IL2 (ou seja, a afinidade da interação de ligação entre IL2 e IL2R (Smith, "Cell Growth Signal Transduction is Quantal" In Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors 766: 263-271, 1995)). O complexo IL2: IL2R é internalizado após a ligação do ligante e os diferentes componentes sofrem classificação diferencial. Quando administrada como um bolus intravenoso (iv), IL2 tem uma depuração sistêmica rápida (uma fase de depuração inicial com meia-vida de 12,9 minutos seguida por uma fase de depuração mais lenta com meia-vida de 85 minutos) (Konrad et al., Cancer Res.50: 2009-2017, 1990).

[00165] Em células eucarióticas, a IL2 humana é sintetizada como um polipeptídeo precursor de 153 aminoácidos, dos quais 20 aminoácidos são removidos para gerar IL2 madura secretada. A IL2 humana recombinante foi produzida em E. coli, em células de inseto e em células COS de mamíferos.

[00166] Os resultados da administração sistêmica de IL2 em pacientes com câncer estão longe dos ideais. Enquanto 15 a 20 por cento dos pacientes respondem objetivamente a altas doses de IL2, a grande maioria não o faz e muitos sofrem graves efeitos colaterais com risco de vida, incluindo náusea, confusão, hipotensão e choque séptico. Tentativas de reduzir a concentração sérica reduzindo a dose e ajustando o regime de dosagem têm sido tentadas e, embora menos

tóxicos, esses tratamentos também foram menos eficazes.

[00167] De acordo com a divulgação, em certas concretizações, os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos compreendem um grupo modificador farmacocinético. Em uma concretização, a porção variante de IL2 ou muteína aqui descrita é ligada a um grupo de modificação farmacocinética. A molécula resultante, daqui em diante referida como "IL2 de farmacocinética estendida (PK)", tem uma meia-vida de circulação prolongada em relação à IL2 livre. A meia-vida de circulação prolongada de IL2 de PK prolongada permite que as concentrações de IL2 no soro in vivo sejam mantidas dentro de uma faixa terapêutica, potencialmente levando à ativação intensificada de muitos tipos de células imunes, incluindo células T. Devido ao seu perfil farmacocinético favorável, a IL2 de PK prolongada pode ser administrada com menos frequência e por períodos mais longos em comparação com a IL2 não modificada.

[00168] Tal como aqui utilizado, "IL2 humana" ou "IL2 humana de tipo selvagem" significa IL2, seja nativa ou recombinante, tendo a sequência de 133 aminoácidos de IL2 humana nativa de ocorrência normal (menos o peptídeo sinal, consistindo de um aminoácido 20 N-terminal adicional ácidos), cuja sequência de aminoácidos é descrita em Fujita, et. al, PNAS USA, 80, 7437-7441 (1983), com ou sem uma metionina N-terminal adicional que é necessariamente incluída quando a proteína é expressa como uma fração intracelular em E. coli. Em uma concretização, IL2 humana compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Em uma concretização, uma variante funcional de IL2 humana

compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99 % idêntica à SEQ ID NO: 17. Em uma concretização, uma variante funcional de IL2 humana se liga ao receptor de IL2, em particular à subunidade alfa do receptor de IL2.

[00169] Em certas concretizações aqui descritas, a porção variante de IL2 ou muteína é fundida a um polipeptídeo heterólogo (isto é, um polipeptídeo que não é IL2 e de preferência não é uma variante de IL2). O polipeptídeo heterólogo pode aumentar a meia-vida circulante de IL2. Conforme discutido em mais detalhes infra, o polipeptídeo que aumenta a meia-vida circulante pode ser albumina sérica, tal como albumina sérica humana ou de camundongo.

[00170] Tal como aqui utilizado, "muteína de IL2" significa uma variante de IL2 (incluindo suas variantes funcionais), em particular um polipéptido em que foram feitas substituições específicas à proteína IL2. Em uma modalidade, as substituições na proteína IL2 humana foram feitas em pelo menos uma posição que contata a subunidade alfa do complexo de receptor $\alpha\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$). Em uma modalidade, tal posição tem um resíduo de aminoácido ácido ou básico em IL2 humana de tipo selvagem, em que se o resíduo de aminoácido for um resíduo de aminoácido ácido em IL2 humana de tipo selvagem a substituição é por um resíduo de aminoácido básico e se o aminoácido resíduo de ácido é um resíduo de aminoácido básico na IL2 humana de tipo selvagem, a substituição é por um resíduo de aminoácido ácido. As concretizações

particularmente preferidas incluem o seguinte: resíduo de lisina (Lys) na posição 35, resíduo de lisina (Lys) na posição 43, resíduo de ácido glutâmico (Glu) na posição 61 e resíduo de ácido glutâmico (Glu) na posição 62, em relação ao humano de tipo selvagem IL2 e numerada de acordo com a IL2 humana de tipo selvagem ou qualquer combinação das mesmas.

[00171] As muteínas de IL2 podem ter uma sequência de aminoácidos idêntica à IL2 de tipo selvagem nos outros resíduos não substituídos (ou seja, as muteínas de IL2 compreendem mutações "mutCD25", por exemplo, aquelas mutações nas quais as sequências de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2 a 6 diferem da sequência de SEQ ID NO: 17). No entanto, as muteínas de IL2 também podem ser caracterizadas por inserções, deleções, substituições e modificações de aminoácidos em um ou mais locais ou em outros resíduos da cadeia polipeptídica de IL2 nativa. De acordo com esta invenção, quaisquer inserções, deleções, substituições e modificações podem resultar em uma muteína de IL2 que retém afinidade para IL2R $\beta\gamma$, embora tenha afinidade reduzida para IL2R $\alpha\beta\gamma$.

[00172] Por exemplo, as muteínas de IL2 também podem ser caracterizadas por substituições de aminoácidos em um ou mais locais ou em outros resíduos da cadeia polipeptídica de IL2 nativa, tais substituições de aminoácidos resultando, por exemplo, em afinidade relativamente aumentada para IL2R $\beta\gamma$ quando comparado a IL2 de tipo selvagem, de modo que a estimulação mediada por IL2 não exija mais o envolvimento de IL2R α (ou seja, as mutações de IL2, além das mutações

mutCD25, também compreendem mutações 'mut $\beta\gamma$ ', por exemplo, aquelas mutações em que a sequência de SEQ ID NO: 18 difere da sequência de SEQ ID NO: 17). Tais mutantes são potentes agonistas de sinalização de IL2. Essas mutações podem estar em resíduos de aminoácidos que contatam IL2R β e/ou IL2R γ .

[00173] Em várias concretizações, as muteínas de IL2 aqui descritas podem diferir da IL2 de tipo selvagem por uma substituição de um ou mais dos resíduos nas posições 24, 65, 74, 80, 81, 85, 86, 89, 92 e 93 de tipo selvagem IL2. O (s) resíduo (s) de aminoácido substituído (s) podem ser, mas não são necessariamente, substituições conservativas.

[00174] Por exemplo, a mutação pode ser: I24V, P65H, Q74R, Q74H, Q74N, Q74S, L80F, L80V, R81 I, R81 T, R81 D, L85V, I86V, I89V, I92F, V93I.

[00175] Em uma concretização, uma muteína IL2 é fornecida, em que a muteína compreende o seguinte conjunto de substituições de aminoácidos: 80F / 81 D / 85V / 86V / 92F. A muteína pode compreender ainda a substituição de aminoácido 42A. A muteína pode compreender ainda uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: 24V, 65H, 74R, 74H, 74N, 74S, 89V, 93I.

[00176] Em algumas concretizações, uma muteína IL2 é fornecida, em que a muteína compreende um conjunto de substituições de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em:

- (i) 74N, 80F, 81D, 85V, 86V, 89V, 92F;
- (ii) 74H, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (iii) 74S, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;
- (iv) 74N, 80F, 81D, 85V, 86V, 92F;

- (v) 80F, 81 D, 85V, 86V, 92F;
- (vi) 80F, 81 D, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I;
- (vii) 18R, 22E, 80F, 81 D, 85 V, 86 V, 89 V, 92F, 93I, 126T;
- (viii) 18R, 22E, 74S, 80F, 81T, 85V, 86V, 89V, 92F, 93I, 126T.

[00177] Por "numerado de acordo com IL2 de tipo selvagem" queremos dizer a identificação de um aminoácido escolhido com referência à posição em que esse aminoácido ocorre normalmente na sequência madura de IL2 de tipo selvagem. Onde inserções ou deleções são feitas na muteína de IL2, um versado na técnica apreciará que um aminoácido que ocorre normalmente em uma determinada posição pode ser deslocado na posição na muteína. No entanto, a localização do aminoácido alterado pode ser facilmente determinada por inspeção e correlação dos aminoácidos flanqueadores com aqueles que flanqueiam o aminoácido em IL2 de tipo selvagem.

[00178] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos e os polinucleotídeos que os codificam podem ser produzidos por qualquer método adequado conhecido na técnica. Tais métodos incluem a introdução de alterações de nucleotídeos apropriadas no ácido nucleico que codifica IL2 ou por síntese *in vitro* do polinucleotídeo ou proteína de IL2. Por exemplo, uma sequência de DNA que codifica o polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito pode ser construída e essas sequências podem ser expressas em um hospedeiro adequadamente transformado ou em qualquer outro sistema de expressão adequado. Este método irá produzir os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos e / ou RNA que

os codifica. No entanto, os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos e os polinucleotídeos que os codificam também podem ser produzidos, embora menos preferivelmente, por síntese química.

[00179] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos podem ligar IL2R $\alpha\beta\gamma$ com uma afinidade que é menor do que a afinidade com a qual IL2 de tipo selvagem se liga a IL2R $\alpha\beta\gamma$. Em uma concretização, os polipeptídeos variantes de IL2 descritos neste relatório descritivo podem se ligar a IL2R $\beta\gamma$ com uma afinidade que é maior do que a afinidade com a qual IL2 de tipo selvagem se liga a IL2R $\beta\gamma$.

[00180] A afinidade de polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos para IL2R $\alpha\beta\gamma$ pode ser pelo menos 2 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 50 vezes ou pelo menos 100 vezes menor do que a afinidade com a qual IL2 de tipo selvagem se liga a IL2R $\alpha\beta\gamma$. Além disso, a afinidade de polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos para IL2R $\beta\gamma$ pode ser pelo menos 2 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 50 vezes ou pelo menos 100 vezes maior do que a afinidade com a qual a IL2 de tipo selvagem se liga a IL2R $\beta\gamma$.

[00181] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos podem ter uma afinidade para IL2R $\beta\gamma$ que é pelo menos 2 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 50 vezes ou pelo menos 100 vezes superior à afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$.

[00182] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos podem ter uma capacidade diminuída para estimular

células T reguladoras do que IL2 de tipo selvagem, em particular quando comparado com a capacidade de estimular células T efetoras e / ou células NK.

[00183] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos podem ter uma mutação (por exemplo, uma deleção, adição ou substituição) de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais resíduos de aminoácidos em relação à IL2 de tipo selvagem.

[00184] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos podem incluir uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 87%, em pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% idêntica à IL2 de tipo selvagem.

[00185] Em uma concretização, os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos têm uma ou mais, de preferência, todas as seguintes propriedades:

1) Ação agonista em IL2R $\beta\gamma$. Esta propriedade pode ser avaliada diretamente em ensaios de proliferação *in vitro* com linhagens celulares dependentes de IL2.

2) Perda de capacidade, em comparação com IL2 de tipo selvagem, para estimular populações *in vitro* e / ou *in vivo* de células T reguladoras. Esta propriedade pode ser avaliada, por exemplo, estudando a capacidade das muteínas, em comparação com aquelas da IL2 de tipo selvagem, para induzir a expansão de células T reguladoras.

3) Aumento do efeito terapêutico em relação à IL2

nativa em modelos animais. Esta propriedade pode ser avaliada, por exemplo, comparando o efeito antitumoral ou anti-metastático dos polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos e a IL2 de tipo selvagem como monoterapia em modelos de tumor transplantáveis (por exemplo, melanoma B16). Também pode ser avaliada por meio do efeito potencializador da resposta celular e / ou humoral a uma vacina de interesse.

[00186] Muitas células imunes aumentam transitoriamente a IL2R $\alpha\beta\gamma$ após a ativação para aumentar a sensibilidade da IL2 ao montar uma resposta imunológica, incluindo a iniciação de células T CD8. Uma vez que alguma ligação de IL2R $\alpha\beta\gamma$ por IL2 pode ser necessária, a presente invenção prevê o uso de uma mistura de polipeptídeos variantes de IL2 seletivos de IL2R $\beta\gamma$ descritos aqui em combinação com IL2 (incluindo suas variantes funcionais) que não demonstra afinidade preferencial para IL2R $\beta\gamma$, tal como IL2 de tipo selvagem. Em certas concretizações, a razão molar de polipeptídeos variantes de IL2 seletivos a IL2R $\beta\gamma$ aqui descritos para IL2 que não demonstra afinidade preferencial para IL2R γ é de 50:1 a 1:1, 20:1 a 2:1, 10:1 a 5:1 ou 5:1 a 3:1.

[00187] Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos podem ser preparados como polipeptídeos de fusão ou quiméricos que incluem uma porção de variante de IL2 e um polipeptídeo heterólogo (isto é, um polipeptídeo que não é IL2 ou uma variante deste). As variantes de IL2 podem ser fundidas a um grupo de PK estendida, o que aumenta a meia-vida de circulação. Exemplos não limitativos de grupos de PK

estendida são descritos infra. Deve ser entendido que outros grupos PK que aumentam a meia-vida de circulação de citocinas, ou variantes das mesmas, também são aplicável à presente divulgação. Em certas concretizações, o grupo de PK estendida é um domínio de albumina sérica (por exemplo, albumina sérica de camundongo, albumina sérica humana).

[00188] Conforme usado neste relatório descritivo, o termo "PK" é um acrônimo para "farmacocinético" e abrange propriedades de um composto incluindo, a título de exemplo, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação por um sujeito. Tal como aqui utilizado, um "grupo de PK estendida" se refere a uma proteína, peptídeo ou fração que aumenta a meia-vida de circulação de uma molécula biologicamente ativa quando fundida ou administrada em conjunto com a molécula biologicamente ativa. Exemplos de um grupo de PK estendida incluem albumina sérica (por exemplo, HSA), fragmentos Fc ou Fc e suas variantes, transferrina e suas variantes e ligantes de albumina sérica humana (HSA) (conforme divulgado nas Publicações US 2005/0287153 e 2007 / 0003549). Outros grupos de PK estendidos exemplificativos são divulgados em Kontermann, Current Opinion in Biotechnology 2011; 22:868-876 e Kontermann, Expert Opin Biol Ther. 2016; 16:903-15 que são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Tal como aqui utilizado, um "IL de PK estendida" se refere a uma porção de interleucina (IL) (incluindo uma porção de variante de IL) em combinação com um grupo de PK de extensão. Em uma concretização, a IL de PK estendida é uma proteína de fusão na qual uma fração de IL está ligada ou fundida a um grupo de PK estendida. Uma proteína de fusão exemplar é uma fusão

HSA / IL2 na qual uma porção IL2 é fundida com HSA.

[00189] Em certas concretizações, a meia-vida sérica de uma IL de PK estendida é aumentada em relação à IL sozinha (isto é, a IL não fundida a um grupo de PK estendida). Em certas concretizações, a meia-vida sérica da IL de PK prolongada é pelo menos 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800 ou 1000% mais longa em relação ao soro meia-vida do IL sozinho. Em certas concretizações, a meia-vida sérica da IL de PK prolongada é de pelo menos 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 dobrado, 7 vezes, 8 vezes, 10 vezes, 12 vezes, 13 vezes, 15 vezes, 17 vezes, 20 vezes, 22 vezes, 25 vezes, 27 vezes, 30 vezes, 35 vezes, 40 vezes ou 50 vezes maior do que a meia-vida sérica da IL sozinha. Em certas concretizações, a meia-vida sérica da IL de PK prolongada é de pelo menos 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 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 ou 200 horas.

[00190] Em certas concretizações, o grupo de PK estendida inclui albumina sérica, ou seus fragmentos ou variantes da albumina sérica ou seus fragmentos (todos os quais, para o propósito da presente divulgação, são compreendidos pelo termo "albumina"). Os polipeptídeos descritos neste relatório descritivo podem ser fundidos com albumina (ou um fragmento ou variante do mesmo) para formar proteínas de fusão de albumina. Essas proteínas de fusão de albumina são descritas na Publicação do pedido de patente EUA No. 20070048282.

[00191] Tal como aqui utilizado, "proteína de fusão de albumina" se refere a uma proteína formada pela fusão de pelo menos uma molécula de albumina (ou um fragmento ou variante desta) a pelo menos uma molécula de uma proteína, como uma proteína terapêutica, em particular, IL2 (ou sua variante). A proteína de fusão de albumina pode ser gerada por tradução de um ácido nucleico em que um polinucleotídeo que codifica uma proteína terapêutica é unido em quadro com um polinucleotídeo que codifica uma albumina. A proteína terapêutica e a albumina, uma vez que parte da proteína de fusão de albumina, podem ser referidas como uma "porção", "região" ou "fração" da proteína de fusão de albumina (por exemplo, uma "porção de proteína terapêutica" ou uma "albumina porção de proteína"). Em uma concretização altamente preferida, uma proteína de fusão de albumina compreende pelo menos uma molécula de uma proteína terapêutica (incluindo, mas não se limitando a uma forma madura da proteína terapêutica) e pelo menos uma molécula de albumina (incluindo, mas não se limitando a uma forma madura de albumina). Em uma concretização, uma proteína de fusão de albumina é processada por uma célula hospedeira, tal como uma célula do órgão alvo para o RNA administrado, por exemplo, uma célula do fígado, e secretada na circulação. O processamento da proteína de fusão de albumina nascente que ocorre nas vias secretoras da célula hospedeira usada para a expressão do RNA pode incluir, mas não está limitado a clivagem do peptídeo sinal; formação de ligações dissulfeto; dobradura adequada; adição e processamento de carboidratos (tais como, por exemplo, glicosilação ligada a

N e O); clivagens proteolíticas específicas; e / ou montagem em proteínas multiméricas. Uma proteína de fusão de albumina é preferencialmente codificada por RNA em uma forma não processada que em particular tem um peptídeo sinal em seu terminal N e após a secreção por uma célula está preferencialmente presente na forma processada em que, em particular, o peptídeo sinal foi clivado. Em uma concretização mais preferida, a "forma processada de uma proteína de fusão de albumina" se refere a um produto de proteína de fusão de albumina que sofreu clivagem de peptídeo de sinal N-terminal, aqui também referido como uma "proteína de fusão de albumina madura".

[00192] Em concretizações preferidas, proteínas de fusão de albumina compreendendo uma proteína terapêutica têm uma estabilidade plasmática superior em comparação com a estabilidade plasmática da mesma proteína terapêutica quando não fundida com albumina. A estabilidade do plasma normalmente se refere ao período de tempo entre o momento em que a proteína terapêutica é administrada in vivo e transportada para a corrente sanguínea e quando a proteína terapêutica é degradada e eliminada da corrente sanguínea, em um órgão, como o rim ou fígado, que finalmente limpa a proteína terapêutica do corpo. A estabilidade plasmática é calculada em termos da meia-vida da proteína terapêutica na corrente sanguínea. A meia-vida da proteína terapêutica na corrente sanguínea pode ser facilmente determinada por ensaios comuns conhecidos no estado da técnica.

[00193] Tal como aqui utilizado, "albumina" se refere coletivamente a proteína albumina ou sequência de

aminoácidos, ou um fragmento de albumina ou variante, tendo uma ou mais atividades funcionais (por exemplo, atividades biológicas) de albumina. Em particular, "albumina" se refere a albumina humana ou fragmentos ou variantes dos mesmos, especialmente a forma madura de albumina humana, ou albumina de outros vertebrados ou fragmentos dos mesmos, ou variantes dessas moléculas. A albumina pode ser derivada de qualquer vertebrado, especialmente qualquer mamífero, por exemplo, humano, vaca, ovelha ou porco. Albuminas não mamíferas incluem, mas não estão limitadas a galinha e salmão. A porção de albumina da proteína de fusão de albumina pode ser de um animal diferente da porção de proteína terapêutica.

[00194] Em certas concretizações, a albumina é albumina de soro humano (HSA), ou fragmentos ou variantes dos mesmos, tais como aqueles divulgados nos documentos US 5,876,969, WO 2011/124718, WO 2013/075066 e WO 2011/0514789.

[00195] Os termos, albumina de soro humano (HSA) e albumina humana (HA) são usados aqui indistintamente. Os termos "albumina e" albumina do soro "são mais amplos e abrangem a albumina do soro humano (e fragmentos e variantes dos mesmos), bem como albumina de outras espécies (e fragmentos e variantes dos mesmos).

[00196] Tal como aqui utilizado, um fragmento de albumina suficiente para prolongar a atividade terapêutica ou estabilidade plasmática da proteína terapêutica se refere a um fragmento de albumina suficiente em comprimento ou estrutura para estabilizar ou prolongar a atividade terapêutica ou estabilidade plasmática da proteína de modo que a estabilidade plasmática da porção de proteína

terapêutica da proteína de fusão de albumina é prolongada ou estendida em comparação com a estabilidade do plasma no estado de não-fusão.

[00197] A porção de albumina das proteínas de fusão de albumina pode compreender o comprimento total da sequência de albumina, ou pode incluir um ou mais fragmentos desta que são capazes de estabilizar ou prolongar a atividade terapêutica ou estabilidade do plasma. Tais fragmentos podem ter 10 ou mais aminoácidos de comprimento ou podem incluir cerca de 15, 20, 25, 30, 50 ou mais aminoácidos contíguos da sequência de albumina ou podem incluir parte ou todos os domínios específicos de albumina. Por exemplo, um ou mais fragmentos de HSA abrangendo os dois primeiros domínios semelhantes a imunoglobulina podem ser usados. Numa concretização preferida, o fragmento de HSA é a forma madura de HSA.

[00198] De um modo geral, um fragmento de albumina ou variante terá pelo menos 100 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 150 aminoácidos de comprimento.

[00199] De acordo com a divulgação, a albumina pode ser albumina de ocorrência natural ou um fragmento ou variante desta. A albumina pode ser albumina humana e pode ser derivada de qualquer vertebrado, especialmente qualquer mamífero. Em uma concretização, a albumina compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 21.

[00200] De preferência, a proteína de fusão de

albumina compreende albumina como a porção N-terminal e uma proteína terapêutica como a porção C-terminal. Alternativamente, uma proteína de fusão de albumina compreendendo albumina como a porção C-terminal, e uma proteína terapêutica como a porção N-terminal também pode ser usada. Em outras concretizações, a proteína de fusão de albumina tem uma proteína terapêutica fundida ao terminal N e ao terminal C da albumina. Em uma concretização preferida, as proteínas terapêuticas fundidas nos terminais N e C são as mesmas proteínas terapêuticas. Em outra concretização preferida, as proteínas terapêuticas fundidas nos terminais N e C são proteínas terapêuticas diferentes. Em uma concretização, as diferentes proteínas terapêuticas podem ser úteis para tratar ou prevenir a mesma ou uma doença, distúrbio ou condição relacionada. Em uma concretização, as diferentes proteínas terapêuticas são ambas citocinas, em que uma das diferentes proteínas terapêuticas é uma variante de IL2 e a outra é de preferência um interferon, como IFN β . Em uma concretização, a proteína de fusão de albumina tem IFN β fundido ao terminal N e uma variante de IL2 fundida ao terminal C da albumina.

[00201] Em uma concretização, a (s) proteína (s) terapêutica (s) é (são) unida (s) à albumina por meio de (a) ligante (s) de peptídeo. Um peptídeo ligante entre as porções fundidas pode fornecer maior separação física entre as porções e, assim, maximizar a acessibilidade da porção de proteína terapêutica, por exemplo, para a ligação ao seu receptor cognato. O peptídeo ligante pode consistir em aminoácidos de modo que seja flexível ou mais rígido. A

sequência de ligação pode ser clivável por uma protease ou quimicamente.

[00202] Tal como aqui utilizado, o termo "região Fc" se refere à porção de uma imunoglobulina nativa formada pelos respectivos domínios Fc (ou porções Fc) das suas duas cadeias pesadas. Tal como aqui utilizado, o termo "domínio Fc" se refere a uma porção ou fragmento de uma única cadeia pesada de imunoglobulina (Ig) em que o domínio Fc não compreende um domínio Fv. Em certas concretizações, um domínio Fc começa na região de dobradiça logo a montante do local de clivagem da papaína e termina no terminal C do anticorpo. Consequentemente, um domínio Fc completo compreende pelo menos um domínio de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3. Em certas concretizações, um domínio Fc compreende pelo menos um de: um domínio de dobradiça (por exemplo, região de dobradiça superior, média e / ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3, um domínio CH4 ou uma variante, porção ou fragmento do mesmo. Em certas concretizações, um domínio Fc compreende um domínio Fc completo (ou seja, um domínio de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3). Em certas concretizações, um domínio Fc compreende um domínio de dobradiça (ou parte dele) fundido a um domínio CH3 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc compreende um domínio CH2 (ou parte dele) fundido a um domínio CH3 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio CH3 ou parte dele. Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio de dobradiça (ou parte dele) e um domínio CH3 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc

consiste em um domínio CH2 (ou parte dele) e um domínio CH3. Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio de dobradiça (ou parte dele) e um domínio CH2 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc carece de pelo menos uma porção de um domínio CH2 (por exemplo, todo ou parte de um domínio CH2). Um domínio Fc aqui geralmente se refere a um polipeptídeo compreendendo todo ou parte do domínio Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Isto inclui, mas não está limitado a polipeptídeos compreendendo os domínios CH1, dobradiça, CH2 e / ou CH3 inteiros, bem como fragmentos de tais peptídeos compreendendo apenas, por exemplo, a dobradiça, CH2 e domínio CH3. O domínio Fc pode ser derivado de uma imunoglobulina de qualquer espécie e / ou qualquer subtipo, incluindo, mas não se limitando a, um anticorpo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE ou IgM. O domínio Fc engloba moléculas Fc nativas e variantes Fc. Conforme estabelecido aqui, será entendido por um versado na técnica que qualquer domínio Fc pode ser modificado de modo que varie na sequência de aminoácidos do domínio Fc nativo de uma molécula de imunoglobulina de ocorrência natural. Em certas concretizações, o domínio Fc tem função efetora reduzida (por exemplo, ligação de FcγR).

[00203] Os domínios Fc de um polipeptídeo aqui descrito podem ser derivados de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, um domínio Fc de um polipeptídeo pode compreender um domínio CH2 e / ou CH3 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, um

domínio Fc pode compreender uma região de dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, um domínio Fc pode compreender uma dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4.

[00204] Em certas concretizações, um grupo de PK estendida inclui um domínio Fc ou fragmentos do mesmo ou variantes do domínio Fc ou fragmentos dos mesmos (todos os quais, para o propósito da presente divulgação, são compreendidos pelo termo "domínio Fc"). O domínio Fc não contém uma região variável que se liga ao antígeno. Os domínios Fc adequados para uso na presente divulgação podem ser obtidos de uma série de fontes diferentes. Em certas concretizações, um domínio Fc é derivado de uma imunoglobulina humana. Em certas concretizações, o domínio Fc é de uma região constante IgG1 humana. Entende-se, no entanto, que o domínio Fc pode ser derivado de uma imunoglobulina de outra espécie de mamífero, incluindo, por exemplo, um roedor (por exemplo, um camundongo, rato, coelho, cobaia) ou primata não humano (por exemplo, chimpanzé, macaco) espécies.

[00205] Além disso, o domínio Fc (ou um fragmento ou variante do mesmo) pode ser derivado de qualquer classe de imunoglobulina, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isótipo de imunoglobulina, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

[00206] Uma variedade de sequências de genes de domínio Fc (por exemplo, sequências de genes de região constante de camundongos e humanos) estão disponíveis na

forma de depósitos acessíveis ao público. Domínios de região constante compreendendo uma sequência de domínio Fc podem ser selecionados sem uma função efetora particular e / ou com uma modificação particular para reduzir a imunogenicidade. Muitas sequências de anticorpos e genes que codificam anticorpos foram publicadas e sequências de domínio Fc adequadas (por exemplo, sequências de dobradiça, CH2 e / ou CH3, ou seus fragmentos ou variantes) podem ser derivadas dessas sequências usando técnicas reconhecidas na técnica.

[00207] Em certas concretizações, o grupo PK-estendido é uma proteína de ligação à albumina sérica, como aquelas descritas em US2005 / 0287153, US2007 / 0003549, US2007 / 0178082, US2007 / 0269422, US2010 / 0113339, W02009 / 083804 e W02009 / 133208, que são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Em certas concretizações, o grupo PK estendido é a transferrina, conforme divulgado em US 7,176,278 e US 8,158,579, que são incorporados neste relatório descritivo por referência em sua totalidade. Em certas concretizações, o grupo PK estendida é uma proteína de ligação a imunoglobulina sérica, como aquelas divulgadas em US2007 / 0178082, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Em certas concretizações, o grupo PK estendido é uma proteína de domínio-esqueleto baseada em fibronectina (Fn) que se liga à albumina sérica, como aquelas divulgadas em US2012 / 0094909, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Métodos de produção de proteínas de domínio de esqueleto à base de fibronectina também são divulgados no documento US2012 / 0094909.

[00208] Em certos aspectos, a IL de PK estendida, adequada para uso de acordo com a divulgação pode empregar um ou mais ligantes peptídicos. Tal como aqui utilizado, o termo "ligante peptídico" se refere a um peptídeo ou sequência polipeptídica que conecta dois ou mais domínios (por exemplo, a porção PK estendida e uma porção IL como IL2) em uma sequência de aminoácidos linear de uma cadeia polipeptídica. Por exemplo, os ligantes peptídicos podem ser usados para conectar uma porção IL2 a um domínio HSA.

[00209] Os ligantes adequados para fundir o grupo de PK estendida a, por exemplo, IL2 são bem conhecidos na técnica. Ligantes exemplificativos incluem ligantes polipeptídeo glicina-serina, ligantes polipeptídeo glicina-prolina e ligantes polipeptídeo prolina-alanina. Em certas concretizações, o ligante é um ligante glicina-serina-polipeptídeo, ou seja, um peptídeo que consiste em resíduos de glicina e serina.

[00210] Além ou no lugar dos polipeptídeos heterólogos descritos acima, um polipeptídeo variante de IL2 descrito neste relatório descritivo pode conter sequências que codificam um "marcador" ou "repórter". Exemplos de genes marcadores ou repórteres incluem b-lactamase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), adenosina desaminase (ADA), aminoglicosídeo fosfotransferase, dihidrofolato redutase (DHFR), higromicina-B-fosfotransferase (HPH), bimidina kidase e xantina guanina fosforibosiltransferase (XGPRT).

[00211] Os antígenos de peptídeo e proteína adequados para uso de acordo com a divulgação incluem tipicamente um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir

uma resposta imune. O peptídeo ou proteína ou epítopo pode ser derivado de um antígeno alvo, isto é, o antígeno contra o qual uma resposta imune deve ser induzida. Por exemplo, o peptídeo ou antígeno de proteína ou o epítopo contido no peptídeo ou antígeno de proteína pode ser um antígeno alvo ou um fragmento ou variante de um antígeno alvo.

[00212] Um antígeno de peptídeo e proteína administrado de acordo com a divulgação (seja per se ou como RNA que codifica o antígeno de peptídeo e proteína), ou seja, um antígeno de vacina, preferencialmente resulta em estimulação, iniciação e / ou expansão de células T no sujeito sendo administrado a antígeno. As referidas células T estimuladas, iniciadas e / ou expandidas são preferencialmente dirigidas contra um antígeno alvo, em particular um antígeno alvo expresso por células, tecidos e / ou órgãos doentes, isto é, um antígeno associado a doenças. Assim, um antígeno de vacina pode compreender o antígeno associado à doença, ou um fragmento ou variante do mesmo. Em uma modalidade, tal fragmento ou variante é imunologicamente equivalente ao antígeno associado à doença. No contexto da presente divulgação, o termo "fragmento de um antígeno" ou "variante de um antígeno" significa um agente que resulta em estimulação, iniciação e / ou expansão de células T que estimulou, iniciou e / ou expandiu o alvo de células T o antígeno, isto é, um antígeno associado a uma doença, em particular quando apresentado por células, tecidos e / ou órgãos doentes. Assim, o antígeno da vacina administrado de acordo com a divulgação pode corresponder a ou pode compreender o antígeno associado à doença, pode corresponder

a ou pode compreender um fragmento do antígeno associado à doença ou pode corresponder a ou pode compreender um antígeno que é homólogo ao antígeno associado à doença ou um fragmento do mesmo. Se o antígeno da vacina administrado de acordo com a divulgação compreender um fragmento do antígeno associado à doença ou uma sequência de aminoácidos que é homóloga a um fragmento do antígeno associado à doença, o referido fragmento ou sequência de aminoácidos pode compreender um epítopo, como uma célula T epítopo do antígeno associado à doença ou uma sequência que é homóloga a um epítopo, como um epítopo de células T do antígeno associado à doença. Assim, de acordo com a divulgação, um antígeno administrado pode compreender um fragmento imunogênico de um antígeno associado à doença ou uma sequência de aminoácidos sendo homóloga a um fragmento imunogênico de um antígeno associado à doença. Um "fragmento imunogênico de um antígeno" de acordo com a divulgação preferencialmente se refere a um fragmento de um antígeno que é capaz de estimular, iniciar e / ou expandir células T quando apresentado no contexto de moléculas de MHC. É preferido que o antígeno da vacina (semelhante ao antígeno associado à doença) possa ser apresentado por uma célula, tal como uma célula apresentadora de antígeno, de modo a fornecer o epítopo relevante para ligação às células T. O antígeno da vacina administrado de acordo com a divulgação pode ser um antígeno recombinante.

[00213] O termo "imunologicamente equivalente" significa que a molécula imunologicamente equivalente, tal como a sequência de aminoácidos imunologicamente equivalente exibe as mesmas ou essencialmente as mesmas propriedades

imunológicas e / ou exerce os mesmos ou essencialmente os mesmos efeitos imunológicos, por exemplo, em relação ao tipo de o efeito imunológico. No contexto da presente divulgação, o termo "imunologicamente equivalente" é preferencialmente usado em relação aos efeitos imunológicos ou propriedades de antígenos ou variantes de antígenos usados para imunização. Por exemplo, uma sequência de aminoácidos é imunologicamente equivalente a uma sequência de aminoácidos de referência se a referida sequência de aminoácidos quando exposta ao sistema imunológico de um sujeito, como células T que se ligam à sequência de aminoácidos de referência ou células que expressam a sequência de aminoácidos de referência induzem uma reação imune tendo uma especificidade de reagir com a sequência de aminoácidos de referência. Assim, uma molécula que é imunologicamente equivalente a um antígeno exibe as mesmas ou essencialmente as mesmas propriedades e / ou exerce os mesmos ou essencialmente os mesmos efeitos em relação à estimulação, iniciação e / ou expansão de células T como o antígeno para o qual as células T são direcionadas.

[00214] O termo "iniciação" se refere a um processo, em que uma célula T tem seu primeiro contato com seu antígeno específico e causa a diferenciação em células T efectoras.

[00215] O termo "expansão clonal" ou "expansão" se refere a um processo em que uma entidade específica é multiplicada. No contexto da presente divulgação, o termo é preferencialmente usado no contexto de uma resposta imunológica em que os linfócitos são estimulados por um antígeno, proliferam e o linfócito específico que reconhece

o referido antígeno é amplificado. De preferência, a expansão clonal leva à diferenciação dos linfócitos.

[00216] O termo "antígeno" se refere a um agente que compreende um epítipo contra o qual uma resposta imune pode ser gerada. O termo "antígeno" inclui, em particular, proteínas e peptídeos. Em uma concretização, um antígeno é apresentado por células do sistema imunológico, como células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas ou macrófagos. Um antígeno ou um produto de processamento do mesmo, como um epítipo de célula T, está em uma concretização ligado por um receptor de célula T ou B, ou por uma molécula de imunoglobulina, como um anticorpo. Consequentemente, um antígeno ou um produto de processamento do mesmo pode reagir especificamente com anticorpos ou linfócitos T (células T). Em uma concretização, um antígeno é um antígeno associado a uma doença, como um antígeno tumoral, um antígeno viral ou um antígeno bacteriano e um epítipo é derivado de tal antígeno.

[00217] O termo "antígeno associado a doença" é usado em seu sentido mais amplo para se referir a qualquer antígeno associado a uma doença. Um antígeno associado à doença é uma molécula que contém epítopos que irão estimular o sistema imunológico de um hospedeiro para produzir uma resposta imunológica específica ao antígeno celular e / ou uma resposta de anticorpo humoral contra a doença. O antígeno associado à doença ou um epítipo do mesmo pode, portanto, ser usado para fins terapêuticos. Os antígenos associados a doenças podem estar associados à infecção por micróbios, normalmente antígenos microbianos, ou associados a câncer,

geralmente tumores.

[00218] O termo "antígeno tumoral" se refere a um constituinte de células cancerosas que pode ser derivado do citoplasma, da superfície celular e do núcleo celular. Em particular, se refere aos antígenos que são produzidos intracelularmente ou como antígenos de superfície em células tumorais. Um antígeno tumoral é tipicamente expresso preferencialmente por células cancerosas (por exemplo, é expresso em níveis mais elevados em células cancerosas do que em células não cancerosas) e, em alguns casos, é expresso apenas por células cancerosas. Exemplos de antígenos tumorais incluem, sem limitação, p53, ART-4, BAGE, beta-catenina / m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27 / m, CDK4 / m, CEA, as proteínas da superfície celular da família claudina, como CLAUDIN-6, CLAUDIN-18.2 e 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 (ou hTRT), LAGE, MUC1, MUM-1, MUM -2, MUM -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, pl90 menor BCR-abL, Pml / RARa, PRAME, proteinase 3, PSA, PSM , RAGE, RU1 ou RU2, SAGE, SART-1 ou SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL / AML1, TPI / m, TRP-1, TRP-2, TRP-2 / INT2 , TPTE, WT e WT-1.

[00219] O termo "antígeno viral" se refere a qualquer componente viral possuindo propriedades antigênicas, isto é, sendo capaz de provocar uma resposta imune em um indivíduo. O antígeno viral pode ser uma ribonucleoproteína viral ou uma proteína de envelope.

[00220] O termo "antígeno bacteriano" se refere a qualquer componente bacteriano possuindo propriedades

antigênicas, isto é, sendo capaz de provocar uma resposta imune em um indivíduo. O antígeno bacteriano pode ser derivado da parede celular ou membrana do citoplasma da bactéria.

[00221] O termo "epítopo" se refere a uma parte ou fragmento de uma molécula, como um antígeno, que é reconhecido pelo sistema imunológico. Por exemplo, o epítopo pode ser reconhecido por células T, células B ou anticorpos. Um epítopo de um antígeno pode incluir uma porção contínua ou descontínua do antígeno e pode estar entre cerca de 5 e cerca de 100, tal como entre cerca de 5 e cerca de 50, mais preferencialmente entre cerca de 8 e cerca de 30, mais preferencialmente entre cerca de 10 e cerca de 25 aminoácidos de comprimento, por exemplo, o epítopo pode ser de preferência 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 aminoácidos em comprimento. Em uma concretização, um epítopo tem entre cerca de 10 e cerca de 25 aminoácidos de comprimento. O termo "epítopo" inclui epítopos de células T.

[00222] O termo "epítopo de célula T" se refere a uma parte ou fragmento de uma proteína que é reconhecida por uma célula T quando apresentada no contexto de moléculas de MHC. O termo "complexo principal de histocompatibilidade" e a abreviatura "MHC" incluem moléculas MHC de classe I e MHC de classe II e referem-se a um complexo de genes que está presente em todos os vertebrados. As proteínas ou moléculas de MHC são importantes para a sinalização entre linfócitos e células apresentadoras de antígenos ou células doentes em reações imunes, em que as proteínas ou moléculas de MHC se

ligam a epítomos peptídicos e os apresentam para reconhecimento por receptores de células T nas células T. As proteínas codificadas pelo MHC são expressas na superfície das células e exibem antígenos próprios (fragmentos de peptídeos da própria célula) e antígenos não próprios (por exemplo, fragmentos de microrganismos invasores) para uma célula T. No caso de complexos MHC / peptídeo de classe I, os peptídeos de ligação têm tipicamente cerca de 8 a cerca de 10 aminoácidos de comprimento, embora peptídeos mais longos ou mais curtos possam ser eficazes. No caso de complexos MHC / peptídeo de classe II, os peptídeos de ligação têm tipicamente cerca de 10 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento e, em particular, cerca de 13 a cerca de 18 aminoácidos de comprimento, enquanto os peptídeos mais longos e mais curtos podem ser eficazes.

[00223] Os termos "célula T" e "linfócito T" são usados indistintamente aqui e incluem células T auxiliares (células T CD4+) e células T citotóxicas (CTLs, células T CD8+) que compreendem células T citolíticas. O termo "célula T específica para o antígeno" ou termos semelhantes referem-se a uma célula T que reconhece o antígeno ao qual a célula T é direcionada, em particular quando apresentada na superfície de células apresentadoras de antígeno ou células doentes, como células cancerosas, no contexto de moléculas de MHC e de preferência exercem funções efetoras de células T, as células T são consideradas específicas para o antígeno se as células matam as células alvo que expressam um antígeno. A especificidade das células T pode ser avaliada usando qualquer uma de uma variedade de técnicas padrão, por

exemplo, dentro de um ensaio de liberação de cromo ou ensaio de proliferação. Alternativamente,

[00224] "Células T reguladoras" ou "Tregs" são uma subpopulação de células T que modulam o sistema imunológico, mantêm a tolerância aos antígenos próprios e previnem doenças autoimunes. Tregs são imunossupressores e geralmente suprimem ou regulam negativamente a indução e a proliferação de células T efectoras. Tregs expressam os biomarcadores CD4, FoxP3 e CD25.

[00225] Tal como aqui utilizado, o termo "célula T naive" se refere a células T maduras que, ao contrário das células T ativadas ou de memória, não encontraram o seu antígeno cognato na periferia. As células T ingênuas são comumente caracterizadas pela expressão de superfície de L-selectina (CD62L), a ausência dos marcadores de ativação CD25, CD44 ou CD69 e a ausência da isoforma CD45RO de memória.

[00226] Tal como aqui utilizado, o termo "células T de memória" se refere a um subgrupo ou subpopulação de células T que encontraram e responderam previamente ao seu antígeno cognato. Em um segundo encontro com o antígeno, as células T de memória podem se reproduzir para montar uma resposta imunológica mais rápida e mais forte do que na primeira vez que o sistema imunológico respondeu ao antígeno. As células T de memória podem ser CD4 + ou CD8 + e geralmente expressam CD45RO.

[00227] Tal como aqui utilizado, o termo "célula NK" ou "célula natural killer" se refere a um subconjunto de linfócitos do sangue periférico definido pela expressão de

CD56 ou CD16 e a ausência do receptor de células T (CD3). Conforme fornecido neste relatório descritivo, a célula NK também pode ser diferenciada de uma célula-tronco ou célula progenitora.

[00228] Em uma concretização, o antígeno alvo é um antígeno tumoral e o peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo ou um fragmento do mesmo (por exemplo, um epítopo) é derivado do antígeno tumoral. O antígeno tumoral pode ser um antígeno "padrão", que é geralmente conhecido por ser expresso em vários cânceres. O antígeno tumoral também pode ser um "neoantígeno", que é específico para o tumor de um indivíduo e não foi previamente reconhecido pelo sistema imunológico. Um neoantígeno ou neoepítopo pode resultar de uma ou mais mutações específicas do câncer no genoma de células cancerosas, resultando em alterações de aminoácidos. Se o antígeno tumoral é um neoantígeno, o peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo preferencialmente compreende um epítopo ou um fragmento do referido neoantígeno compreendendo uma ou mais alterações de aminoácidos.

[00229] As mutações do câncer variam com cada indivíduo. Assim, as mutações do câncer que codificam novos epítopos (neo-epítopos) representam alvos atraentes no desenvolvimento de composições de vacinas e imunoterapias. A eficácia da imunoterapia tumoral depende da seleção de antígenos e epítopos específicos do câncer capazes de induzir uma resposta imune potente dentro de um hospedeiro. O RNA pode ser usado para fornecer epítopos tumorais específicos do paciente a um paciente. As células dendríticas (DCs) que

residem no baço representam células apresentadoras de antígeno de interesse particular para a expressão de RNA de epítomos imunogênicos ou antígenos, como epítomos tumorais. O uso de múltiplos epítomos mostrou promover eficácia terapêutica em composições de vacinas tumorais. A sequenciação rápida do mutanoma tumoral pode fornecer epítomos múltiplos para vacinas individualizadas que podem ser codificadas pelo RNA aqui descrito, por exemplo, como um único polipeptídeo em que os epítomos são opcionalmente separados por ligantes. Em certas modalidades da presente divulgação, o RNA codifica pelo menos um epítomo, pelo menos dois epítomos, pelo menos três epítomos, pelo menos quatro epítomos, pelo menos cinco epítomos, pelo menos seis epítomos, pelo menos sete epítomos, pelo menos oito epítomos, pelo menos nove epítomos, ou pelo menos dez epítomos. As modalidades exemplares incluem RNA que codifica pelo menos cinco epítomos (denominado um "pentatopo") e RNA que codifica pelo menos dez epítomos (denominado um "decatopo").

[00230] O antígeno de peptídeo e proteína pode ser de 2 a 100 aminoácidos, incluindo, por exemplo, 5 aminoácidos, 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, 25 aminoácidos, 30 aminoácidos, 35 aminoácidos, 40 aminoácidos, 45 aminoácidos, ou 50 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, um peptídeo pode ter mais de 50 aminoácidos. Em algumas concretizações, o peptídeo pode ter mais de 100 aminoácidos.

[00231] O peptídeo ou antígeno de proteína pode ser qualquer peptídeo ou proteína que pode induzir ou aumentar a capacidade do sistema imunológico de desenvolver

anticorpos e respostas de células T ao peptídeo ou proteína.

[00232] Em certas concretizações, os inibidores do ponto de verificação imunológico são usados em combinação com outros agentes terapêuticos aqui descritos (por exemplo, RNA que codifica um polipeptídeo variante de interleucina (IL) -2 e, opcionalmente, RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítipo).

[00233] Tal como aqui utilizado, "ponto de verificação imunológico" se refere a sinais co-estimuladores e inibidores que regulam a amplitude e a qualidade do reconhecimento do receptor de células T de um antígeno. Em certas concretizações, o ponto de verificação imunológico é um sinal inibitório. Em certas concretizações, o sinal inibitório é a interação entre PD-1 e PD-L1. Em certas concretizações, o sinal inibitório é a interação entre CTLA-4 e CD80 ou CD86 para deslocar a ligação de CD28. Em certas concretizações, o sinal inibidor é a interação entre as moléculas LAG3 e MHC de classe II. Em certas concretizações, o sinal inibitório é a interação entre TIM3 e galectina 9.

[00234] Tal como aqui utilizado, "inibidor de ponto de controle imunológico" se refere a uma molécula que reduz, inibe, interfere ou modula uma ou mais proteínas de ponto de controle total ou parcialmente. Em certas concretizações, o inibidor do ponto de controle imunológico evita sinais inibitórios associados ao ponto de controle imunológico. Em certas concretizações, o inibidor do ponto de controle imunológico é um anticorpo ou fragmento do mesmo que interrompe a sinalização inibitória associada ao ponto de controle imunológico. Em certas concretizações, o inibidor

do ponto de controle imunológico é uma pequena molécula que interrompe a sinalização inibitória. Em certas concretizações, o inibidor de checkpoint imune é um anticorpo, fragmento deste ou imitador de anticorpo, que evita a interação entre proteínas bloqueadoras de checkpoint, por exemplo, um anticorpo, ou fragmento deste, que evita a interação entre PD-1 e PD-L1. Em certas concretizações, o inibidor do ponto de verificação imunológico é um anticorpo, ou fragmento do mesmo, que evita a interação entre CTLA-4 e CD80 ou CD86. Em certas concretizações, o inibidor do ponto de controle imunológico é um anticorpo, ou fragmento do mesmo, que evita a interação entre LAG3 e seus ligantes, ou TIM-3 e seus ligantes. O inibidor de checkpoint também pode estar na forma solúvel das próprias moléculas (ou suas variantes), por exemplo, uma fusão PD-L1 ou PD-L1 solúvel.

[00235] O receptor de "Morte Programada-1 (PD-1)" se refere a um receptor imuno-inibitório pertencente à família CD28. PD-1 é expresso predominantemente em células T previamente ativadas in vivo e se liga a dois ligantes, PD-L1 e PD-L2. O termo "PD-G, tal como aqui utilizado, inclui PD-1 humano (hPD-1), variantes, isoformas e homólogos de espécies de hPD-1 e análogos com pelo menos um epítipo comum com hPD-1 "Programmed Death Ligand-1 (PD-L1)" é um dos dois ligantes de glicoproteína de superfície celular para PD-1 (sendo o outro PD-L2) que regula negativamente a ativação de células T e a secreção de citocinas após a ligação a PD-1. O termo "PD-L1", tal como aqui utilizado, inclui PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas e homólogos de espécies de

hPD-L1 e análogos com pelo menos um epítopo comum com hPD-L1.

[00236] "Antígeno 4 Associado a Linfócitos T Citotóxicos (CTLA-4)" é uma molécula de superfície de células T e é um membro da superfamília das imunoglobulinas. Esta proteína desregula o sistema imunológico ligando-se a CD80 e CD86. O termo "CTLA-4", conforme aqui utilizado, inclui CTLA-4 humana (hCTLA-4), variantes, isoformas e espécies homólogas de hCTLA-4 e análogos com pelo menos um epítopo comum com hCTLA-4.

[00237] "Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG3)" é um receptor inibitório associado à inibição da atividade de linfócitos por ligação a moléculas MHC de classe II. Este receptor aumenta a função das células Treg e inibe a função das células T efectoras CD8 +. O termo "LAG3", tal como aqui utilizado, inclui LAG3 humana (hLAG3), variantes, isoformas e espécies homólogas de hLAG3 e análogos com pelo menos um epítopo comum.

[00238] "T Cell Membrane Protein-3 (TIM3)" é um receptor inibidor envolvido na inibição da atividade dos linfócitos pela inibição das respostas das células TH1. Seu ligante é a galectina 9, que é regulada positivamente em vários tipos de câncer. O termo TIM3 ", tal como aqui utilizado, inclui TIM3 humano (hTIM3), variantes, isoformas e homólogos de espécies de hTIM3 e análogos com pelo menos um epítopo comum.

[00239] A "família B7" se refere a ligantes inibitórios com receptores indefinidos. A família B7 engloba B7-H3 e B7-H4, ambos regulados positivamente nas células

tumorais e nas células infiltrantes do tumor.

[00240] Em certas concretizações, o inibidor de ponto de verificação imunológico adequado para uso nos métodos aqui divulgados é um antagonista de sinais inibidores, por exemplo, um anticorpo que tem como alvo, por exemplo, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, B7- H3, B7-H4 ou TIM3. Estes ligandos e receptores são revistos em Pardoll, D., Nature. 12: 252-264, 2012.

[00241] Em certas concretizações, o inibidor do ponto de verificação imunológico é um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que interrompe ou inibe a sinalização de um imunorregulador inibitório. Em certas concretizações, o inibidor do ponto de controle imunológico é uma pequena molécula que interrompe ou inibe a sinalização de um imunorregulador inibitório.

[00242] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização PD-1 / PD-L1. Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem a administração a um sujeito de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que interrompe a interação entre o receptor PD-1 e seu ligante, PD-L1. Os anticorpos que se ligam a PD-1 e interrompem a interação entre PD-1 e seu ligante, PD-L1, são conhecidos na técnica. Em certas concretizações, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente a PD-1. Em certas concretizações, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente a PD-L1 e inibe sua interação com PD-1, aumentando, assim, a atividade imunológica.

[00243] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização CTLA4. Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem a administração a um sujeito de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo CTLA4 e interrompe sua interação com CD80 e CD86.

[00244] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização LAG3 (gene 3 de ativação de linfócitos). Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem a administração a um sujeito de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo LAG3 e interrompe sua interação com moléculas de MHC de classe II.

[00245] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização da família B7. Em certas concretizações, os membros da família B7 são B7-H3 e B7-H4. Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem a administração a um sujeito de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo B7-H3 ou H4. A família B7 não tem nenhum receptor definido, mas esses ligantes são regulados positivamente em células tumorais ou células infiltrantes de tumor. Modelos de camundongos pré-clínicos demonstraram que o bloqueio desses ligantes pode aumentar a imunidade antitumoral.

[00246] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização TIM3 (proteína 3 da membrana da célula T). Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem a administração a um

sujeito de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo TIM3 e interrompe sua interação com a galectina 9.

[00247] Será entendido por um técnico versado no assunto que outros alvos de ponto de verificação imune também podem ser direcionados por antagonistas ou anticorpos, desde que o direcionamento resulte na estimulação de uma resposta imune, tal como uma resposta imune antitumoral refletida em, por exemplo, um aumento na proliferação de células T, ativação intensificada de células T e / ou produção aumentada de citocinas (por exemplo, IFN- γ , IL2).

[00248] De acordo com a divulgação, o termo "anticorpo" se refere a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfeto. O termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantes, anticorpos humanos, anticorpos humanizados e anticorpos quiméricos. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da cadeia pesada (aqui abreviada como VH) e uma região constante da cadeia pesada. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região constante da cadeia leve. As regiões VH e VL podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada VH e VL é composto por três CDRs e quatro FRs, arranjado do terminal amino para o terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis

das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complemento clássico.

[00249] Os anticorpos podem ser derivados de diferentes espécies, incluindo, mas não se limitando a camundongo, rato, coelho, porquinho da índia e humano.

[00250] Os anticorpos aqui descritos incluem IgA, tais como IgA1 ou IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e anticorpos IgD. Em várias concretizações, o anticorpo é um anticorpo IgG1, mais particularmente um isotipo IgG1, kappa ou IgG1, lambda (ou seja, IgG1, k, l), um anticorpo IgG2a (por exemplo, IgG2a, k, l), um anticorpo IgG2b (por exemplo, IgG2b, k, l), um anticorpo IgG3 (por exemplo, IgG3, k, l) ou um anticorpo IgG4 (por exemplo, IgG4, k, l).

[00251] Os termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de ligação") ou "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "fragmento de ligação") ou termos semelhantes referem-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consistem nos domínios VL, VH, CL e CH;

(ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) fragmentos Fd consistindo nos domínios VH e CH; (iv) fragmentos Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consistem num domínio VH; (vi) regiões determinantes de complementaridade isoladas (CDR) e (vii) combinações de duas ou mais CDRs isoladas que podem ser opcionalmente unidas por um ligante sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam feitos como uma única cadeia de proteína na qual o VL e as regiões VH emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); ver, por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; e Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Esses anticorpos de cadeia simples também se destinam a ser abrangidos pelo termo "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Um outro exemplo são proteínas de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação compreendendo (i) um polipeptídeo de domínio de ligação que é fundido a um polipeptídeo de região de dobradiça de imunoglobulina, (ii) uma região constante CH2 de cadeia pesada de imunoglobulina fundida à região de dobradiça, e (iii) uma imunoglobulina região constante CH3 da cadeia pesada fundida à região constante CH2. O polipeptídeo do domínio de ligação pode ser uma região variável da cadeia pesada ou uma região variável da cadeia

leve. As proteínas de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação são ainda divulgadas no documento US 2003/0118592 e US 2003/0133939. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas pelos técnicos versados no assunto, e os fragmentos são rastreados quanto à utilidade da mesma maneira que os anticorpos intactos.

[00252] É particularmente preferido de acordo com a invenção que os peptídeos, proteínas ou polipeptídeos aqui descritos, em particular os polipeptídeos variantes de IL2 e / ou antígenos, sejam administrados na forma de RNA que codifica os peptídeos, proteínas ou polipeptídeos aqui descritos. Em uma concretização, diferentes peptídeos, proteínas ou polipeptídeos aqui descritos são codificados por diferentes moléculas de RNA.

[00253] De acordo com a divulgação, após a administração do RNA aqui descrito, pelo menos uma porção do RNA é entregue a uma célula alvo. Em uma concretização, pelo menos uma porção do RNA é entregue ao citosol da célula alvo. Em uma concretização, o RNA é traduzido pela célula alvo para produzir o peptídeo ou proteína codificada.

[00254] Alguns aspectos da divulgação envolvem a entrega direcionada do RNA divulgado neste relatório descritivo (RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 e, opcionalmente, RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítipo) a certos tecidos.

[00255] Em uma concretização, a divulgação envolve direcionar o sistema linfático, em particular, os órgãos linfoides secundários, mais especificamente, o baço. Ter como alvo o sistema linfático, em particular, os órgãos

linfoides secundários, mais especificamente, o baço, é em particular preferido se o RNA administrado for RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo.

[00256] Em uma concretização, a célula alvo é uma célula do baço. Em uma concretização, a célula alvo é uma célula de apresentação de antígeno, como uma célula de apresentação de antígeno profissional no baço. Em uma concretização, a célula alvo é uma célula dendrítica no baço.

[00257] O "sistema linfático" faz parte do sistema circulatório, e, é uma parte importante do sistema imunológico, compreendendo uma rede de vasos linfáticos que transportam a linfa. O sistema linfático consiste em órgãos linfáticos, uma rede condutora de vasos linfáticos e a linfa circulante. Os órgãos linfoides primários ou centrais geram linfócitos a partir de células progenitoras imaturas. O timo e a medula óssea constituem os órgãos linfoides primários. Os órgãos linfoides secundários ou periféricos, que incluem os nódulos linfáticos e o baço, mantêm os linfócitos virgens maduros e iniciam uma resposta imune adaptativa.

[00258] O RNA pode ser entregue ao baço pelas chamadas formulações de lipoplex, nas quais o RNA está ligado a lipossomas compreendendo um lipídio catiônico e, opcionalmente, um lipídio adicional ou auxiliar para formar formulações de nanopartículas injetáveis. Os lipossomas podem ser obtidos por injeção de uma solução dos lipídios em etanol em água ou uma fase aquosa adequada. Partículas de RNA lipoplex podem ser preparadas misturando os lipossomas com RNA. Partículas de lipoplex de RNA de direcionamento de baço são descritas no documento WO 2013/143683, aqui

incorporado por referência. Verificou-se que as partículas de RNA lipoplex com uma carga líquida negativa podem ser utilizadas para visar preferencialmente o tecido do baço ou células do baço, tais como células apresentadoras de antígeno, em particular, células dendríticas. Consequentemente, após a administração das partículas de RNA lipoplex, ocorre a acumulação de RNA e / ou a expressão de RNA no baço. Assim, as partículas de RNA lipoplex da divulgação podem ser usadas para expressar RNA no baço. Em uma concretização, após a administração das partículas de RNA lipoplex, ocorre nenhuma ou praticamente nenhuma acumulação de RNA e / ou expressão de RNA no pulmão e / ou fígado. Em uma concretização, após a administração das partículas de RNA lipoplex, RNA ocorre acúmulo e / ou expressão de RNA em células apresentadoras de antígeno, tais como células apresentadoras de antígeno profissionais no baço. Assim, as partículas de RNA lipoplex da divulgação podem ser usadas para expressar RNA em tais células de apresentação de antígeno. Em uma concretização, as células apresentadoras de antígeno são células dendríticas e / ou macrófagos.

[00259] No contexto da presente divulgação, o termo "partícula de RNA lipoplex" se refere a uma partícula que contém lipídio, em particular, lipídio catiônico e RNA. As interações eletrostáticas entre lipossomas carregados positivamente e RNA carregado negativamente resultam na complexação e formação espontânea de partículas de lipoplexo de RNA. Lipossomas carregados positivamente podem ser geralmente sintetizados usando um lipídio catiônico, como

DOTMA, e lipídios adicionais, como DOPE. Em uma concretização, uma partícula de lipoplexo de RNA é uma nanopartícula.

[00260] Tal como aqui utilizado, um "lipídio catiônico" se refere a um lipídio com uma carga líquida positiva. Os lipídios catiônicos ligam o RNA carregado negativamente por interação eletrostática à matriz lipídica. Geralmente, os lipídios catiônicos possuem uma porção lipofílica, como um esterol, uma cadeia de acil ou diacil, e o grupo principal do lipídio normalmente carrega a carga positiva. Exemplos de lipídeos catiônicos incluem, mas não estão limitados a 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamônio propano (DOTMA), dimetildiocetadecilamônio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP); 1,2-diaciloxi-3-dimetilamônio propanos; Propanos 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamônio; cloreto de dioctadecildimetil amônio (DODAC), 2,3-di (tetradecoxi) propil- (2-hidroxietil) -dimetilazônio (DMRIE), 1, 2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1, 2-dimiristoil-3-trimetilamônio propano (DMTAP), 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil brometo de amônio (DORIE) e 2,3 trifluoroacetato de -dioleoiloxi-N- [2 (espermina carboxamida) etil] -N, N-dimetil-1-propanâmio (DOSPA). Os preferidos são DOTMA, DOTAP, DODAC e DOSPA. Em concretizações específicas, o lipídio catiônico é DOTMA e / ou DOTAP.

[00261] Um lipídio adicional pode ser incorporado para ajustar a razão geral de carga positiva para negativa e a estabilidade física das partículas de RNA lipoplexo. Em

certas concretizações, o lipídio adicional é um lipídio neutro. Tal como aqui utilizado, um "lipídio neutro" se refere a um lipídio com uma carga líquida de zero. Exemplos de lipídeos neutros incluem, mas não estão limitados a, 1,2-di- (9Z-octadecenoil) -sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidil etanol amina, ceramida, esfingoemielina, cefalina, colesterol e cerebrosídeo. Em concretizações específicas, o lipídio adicional é DOPE, colesterol e / ou DOPC.

[00262] Em certas concretizações, as partículas de RNA lipoplex incluem um lipídio catiônico e um lipídio adicional. Em uma concretização exemplar, o lipídio catiônico é DOTMA e o lipídio adicional é DOPE.

[00263] Em algumas concretizações, a razão molar do pelo menos um lipídio catiônico para o pelo menos um lipídio adicional é de cerca de 10:0 a cerca de 1:9, cerca de 4:1 a cerca de 1:2, ou cerca de 3:1 a cerca de 1:1. Em concretizações específicas, a razão molar pode ser cerca de 3:1, cerca de 2,75:1, cerca de 2,5:1, cerca de 2,25:1, cerca de 2:1, cerca de 1,75:1, cerca de 1,5:1, cerca de 1,25:1, ou cerca de 1:1. Em uma concretização exemplificativa, a razão molar de pelo menos um lipídio catiônico para o pelo menos um lipídio adicional é de cerca de 2:1.

[00264] Partículas de RNA lipoplex aqui descritas têm um diâmetro médio que em uma concretização varia de cerca de 200 nm a cerca de 1000 nm, de cerca de 200 nm a cerca de 800 nm, de cerca de 250 a cerca de 700 nm, de cerca de 400 a cerca de 600 nm, de cerca de 300 nm a cerca de 500 nm, ou de

cerca de 350 nm a cerca de 400 nm. Em concretizações específicas, as partículas de RNA lipoplex têm um diâmetro médio de cerca de 200 nm, cerca de 225 nm, cerca de 250 nm, cerca de 275 nm, cerca de 300 nm, cerca de 325 nm, cerca de 350 nm, cerca de 375 nm, cerca de 400 nm, cerca de 425 nm, cerca de 450 nm, cerca de 475 nm, cerca de 500 nm, cerca de 525 nm, cerca de 550 nm, cerca de 575 nm, cerca de 600 nm, cerca de 625 nm, cerca de 650 nm, cerca de 700 nm, cerca de 725 nm, cerca de 750 nm , cerca de 775 nm, cerca de 800 nm, cerca de 825 nm, cerca de 850 nm, cerca de 875 nm, cerca de 900 nm, cerca de 925 nm, cerca de 950 nm, cerca de 975 nm ou cerca de 1000 nm. Em uma concretização, as partículas de RNA lipoplex têm um diâmetro médio que varia de cerca de 250 nm a cerca de 700 nm. Em outra concretização, as partículas de RNA lipoplex têm um diâmetro médio que varia de cerca de 300 nm a cerca de 500 nm. Em uma concretização exemplar, as partículas de RNA lipoplex têm um diâmetro médio de cerca de 400 nm.

[00265] A carga elétrica das partículas de lipoplexo de RNA da presente divulgação é a soma das cargas elétricas presentes em pelo menos um lipídio catiônico e as cargas elétricas presentes no RNA. A razão de carga é a razão entre as cargas positivas presentes no pelo menos um lipídio catiônico e as cargas negativas presentes no RNA. A razão de carga das cargas positivas presentes em pelo menos um lipídio catiônico para as cargas negativas presentes no RNA é calculado pela seguinte equação: razão de carga =
$$\frac{[(\text{concentração de lipídio catiônico (mol)}) * (\text{o número total de cargas positivas no lipídio catiônico})]}{[(\text{concentração de RNA}) * (\text{o número total de cargas negativas no RNA})]}$$

de RNA (mol)) * (o número total de cargas negativas no RNA)].

[00266] O baço que alveja as partículas de RNA lipoplex descritas neste relatório descritivo em pH fisiológico, de preferência, têm uma carga negativa líquida, como uma razão de carga de cargas positivas para cargas negativas de cerca de 1,9:2 a cerca de 1:2. Em concretizações específicas, a razão de carga de cargas positivas para cargas negativas nas partículas de RNA lipoplex em pH fisiológico é de cerca de 19:2,0, cerca de 18:2,0, cerca de 17:2,0, cerca de 16: 2,0, cerca de 1,5:2,0, cerca de 1,3:2,0, cerca de 1,3:2,0, cerca de 1,2:2,0, cerca de 1,1:2,0 ou cerca de 1:2,0.

[00267] Os sistemas de entrega de RNA têm uma preferência inerente ao fígado. Isso se refere a partículas à base de lipídios, nanopartículas catiônicas e neutras, em particular nanopartículas de lipídeos, como lipossomas, nanomicelas e ligantes lipofílicos em bioconjugados. A acumulação hepática é causada pela natureza descontínua da vasculatura hepática ou do metabolismo lipídico (lipossomas e conjugados de lipídio ou colesterol).

[00268] Em uma concretização da distribuição direcionada de um polipeptídeo variante de IL2 aqui descrito, o órgão alvo é o fígado e o tecido alvo é o tecido hepático. A entrega a tal tecido alvo é preferida, em particular, se a presença do polipeptídeo variante de IL2 neste órgão ou tecido for desejada e / ou se for desejado expressar grandes quantidades do polipeptídeo variante de IL2 e / ou se a presença sistêmica do polipeptídeo variante de IL2, em particular, em quantidades significativas, é desejado ou

necessário.

[00269] Em uma concretização, o RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 é administrado em uma formulação para direcionar o fígado. Tais formulações são aqui descritas acima.

[00270] Para a entrega *in vivo* de RNA ao fígado, um sistema de entrega de drogas pode ser usado para transportar o RNA para o fígado, evitando sua degradação. Por exemplo, nanomicelas poliplex que consistem em uma superfície revestida com polietilenoglicol (PEG) e um núcleo contendo mRNA é um sistema útil porque as nanomicelas fornecem excelente estabilidade *in vivo* do RNA, sob condições fisiológicas. Além disso, a propriedade furtiva fornecida pela superfície da nanomicela poliplex, composta de densas paliçadas de PEG, efetivamente evita as defesas imunológicas do hospedeiro.

[00271] Os peptídeos, proteínas, polipeptídeos, RNA, partículas de RNA e outros agentes, por exemplo, inibidores de checkpoint imunológico, aqui descritos podem ser administrados em composições farmacêuticas ou medicamentos para tratamentos terapêuticos ou profiláticos e podem ser administrados na forma de qualquer composição farmacêutica adequada.

[00272] O termo "composição farmacêutica" se refere a uma formulação compreendendo um agente terapeuticamente eficaz, de preferência junto com veículos, diluentes e / ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis. A referida composição farmacêutica é útil para o tratamento, prevenção ou redução da gravidade de uma doença ou distúrbio por

administração da referida composição farmacêutica a um sujeito. Uma composição farmacêutica também é conhecida na técnica como uma formulação farmacêutica. No contexto da presente divulgação, a composição farmacêutica compreende peptídeos, proteínas, polipeptídeos, RNA, partículas de RNA e / ou outros agentes, conforme descrito neste relatório descritivo.

[00273] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem compreender um ou mais adjuvantes ou podem ser administradas com um ou mais adjuvantes. O termo "adjuvante" se refere a um composto que prolonga, aumenta ou acelera uma resposta imunológica. Os adjuvantes compreendem um grupo heterogêneo de compostos como emulsões de óleo (por exemplo, adjuvantes de Freund), compostos minerais (como alúmen), produtos bacterianos (como a toxina de Bordetella pertussis) ou complexos imunoestimulantes. Exemplos de adjuvantes incluem, sem limitação, LPS, GP96, oligodesoxinucleotídeos CpG, fatores de crescimento e citocinas, tais como monocinas, linfocinas, interleucinas, quimiocinas. As quimiocinas podem ser IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL12, IFN α , IFN γ , GM-CSF, LT-a. Outros adjuvantes conhecidos são hidróxido de alumínio, adjuvantes de Freund ou óleo como Montanide® ISA51. Outros adjuvantes adequados para uso na presente divulgação incluem lipopeptídeos, tais como Pam3Cys.

[00274] As composições farmacêuticas, de acordo com a presente divulgação, são geralmente aplicadas em uma "quantidade farmacologicamente eficaz", e, em "uma preparação farmacologicamente aceitável".

[00275] O termo "farmaceuticamente aceitável" se refere à não toxicidade de um material que não interage com a ação do componente ativo da composição farmacêutica.

[00276] O termo "quantidade farmaceuticamente eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere à quantidade que atinge uma reação desejada ou um efeito desejado sozinho ou em conjunto com outras doses. No caso do tratamento de uma doença particular, a reação desejada se refere preferencialmente à inibição do curso da doença. Isto consiste em abrandar a progressão da doença e, em particular, interromper ou inverter a sua evolução. A reação desejada no tratamento de uma doença também pode ser o retardo do início ou a prevenção do início da referida doença ou condição. Uma quantidade eficaz das composições aqui descritas dependerá da condição a ser tratada, da gravidade da doença, dos parâmetros individuais do paciente, incluindo idade, condição fisiológica, tamanho e peso, a duração do tratamento, o tipo de terapia associada (se presente), a via de administração específica e fatores semelhantes. Consequentemente, as doses administradas das composições aqui descritas podem depender de vários desses parâmetros. No caso de uma reação em um paciente ser insuficiente com uma dose inicial, podem ser usadas doses mais altas (ou doses efetivamente mais altas alcançadas por uma via de administração diferente e mais localizada).

[00277] As composições farmacêuticas da presente divulgação podem conter sais, tampões, conservantes e, opcionalmente, outros agentes terapêuticos. Em uma concretização, as composições farmacêuticas da presente

divulgação compreendem um ou mais veículos, diluentes e / ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[00278] Conservantes adequados para uso nas composições farmacêuticas da presente divulgação incluem, sem limitação, cloreto de benzalcônio, clorobutanol, parabeno e timerosal.

[00279] O termo "excipiente", conforme usado neste relatório descritivo, se refere a uma substância que pode estar presente em uma composição farmacêutica da presente divulgação, mas não é um ingrediente ativo. Exemplos de excipientes incluem, sem limitação, transportadores, aglutinantes, diluentes, lubrificantes, espessantes, agentes tensoativos, conservantes, estabilizantes, emulsificantes, tampões, agentes aromatizantes ou corantes.

[00280] O termo "diluente" se refere a um agente diluente e / ou diluente. Além disso, o termo "diluente" inclui qualquer um ou mais de um fluido, suspensão líquida ou sólida e / ou meios de mistura. Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água.

[00281] O termo "transportador" se refere a um componente que pode ser natural, sintético, orgânico, inorgânico no qual o componente ativo é combinado a fim de facilitar, aumentar ou permitir a administração da composição farmacêutica. Um transportador, tal como aqui utilizado, pode ser um ou mais enchimentos, diluentes ou substâncias encapsulantes sólidas ou líquidos compatíveis, que são adequados para administração a um sujeito. O transportador adequado inclui, sem limitação, água estéril, Ringer, Ringer lactato, solução de cloreto de sódio estéril,

solução salina isotônica, polialquilenoglicóis, naftalenos hidrogenados e, em particular, polímeros de lactídeo biocompatíveis, copolímeros de lactídeo / glicolídeo ou copolímeros de polioxietileno / polioxi-propileno. Em uma concretização, a composição farmacêutica da presente divulgação inclui solução salina isotônica.

[00282] Os veículos, excipientes ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos no estado da técnica farmacêutica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

[00283] Os veículos, excipientes ou diluentes farmacêuticos podem ser selecionados em relação à via de administração pretendida e à prática farmacêutica padrão.

[00284] Em uma concretização, as composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas por via intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intradérmica ou intramuscular. Em certas concretizações, a composição farmacêutica é formulada para administração local ou administração sistêmica. A administração sistêmica pode incluir a administração enteral, que envolve a absorção através do trato gastrointestinal, ou administração parenteral. Tal como aqui utilizado, "administração parentérica" se refere à administração de qualquer maneira que não seja através do trato gastrointestinal, tal como por injeção intravenosa. Em uma concretização preferida, as composições farmacêuticas são formuladas para administração sistêmica. Em outra concretização preferida, a administração sistêmica é por administração intravenosa.

[00285] O termo "coadministração", tal como aqui utilizado, significa um processo pelo qual diferentes compostos ou composições (por exemplo, RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2, RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo e opcionalmente um inibidor de ponto de controle imunológico) são administrados ao mesmo paciente. O RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 e o RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo podem ser administrados simultaneamente, essencialmente ao mesmo tempo, ou sequencialmente. Se a administração ocorrer sequencialmente, o RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 pode ser administrado antes ou após a administração do RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo. Se a administração ocorrer simultaneamente, o RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 e o RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo não precisam ser administrados na mesma composição. O RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 e o RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo podem ser administrados uma ou mais vezes e o número de administrações de cada componente pode ser o mesmo ou diferente. Além disso, o RNA que codifica um polipeptídeo variante de IL2 e o RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo não precisam ser administrados no mesmo local.

[00286] Os polipeptídeos variantes de IL2, os polinucleotídeos que codificam polipeptídeos variantes de IL2, as células hospedeiras compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2, as composições

farmacêuticas e os métodos de tratamento aqui descritos podem ser usados no tratamento terapêutico ou profilático de várias doenças, em doenças particulares em que o fornecimento de IL2, especificamente dos polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos, a um sujeito resulta em um efeito terapêutico ou profilático, como câncer, doenças autoimunes, doenças infecciosas, vacina adjuvante na vacina contra o câncer e terapia de vacina convencional, para estimulação imunológica em os idosos ou indivíduos imunocomprometidos de outra forma, bem como em pacientes com HIV ou SCID humano, ou outra aplicação terapêutica que requeira estimulação geral do sistema imunológico em qualquer animal adequado, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente, humano. IL2 tem muitos efeitos. Alguns deles são a estimulação de células T, em particular células T de memória, células T virgens e / ou células T efetoras e / ou células NK. Os polipeptídeos variantes de IL2 aqui descritos terão atividades em tipos de células que expressam apenas o receptor de IL2 de afinidade intermediária, como células T de memória, células T virgens e / ou células T efetoras, mas não o receptor de IL2 de alta afinidade, como células T reguladoras. Por conseguinte, é contemplado o uso dos polipeptídeos variantes de IL2, os polinucleotídeos que codificam polipeptídeos variantes de IL2, as células hospedeiras compreendendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo variante de IL2, as composições farmacêuticas e os métodos de tratamento aqui descritos no tratamento das doenças em que IL2 é esperado para fornecer uma terapia eficaz devido à sua atividade de células T.

[00287] Alternativamente, ou além dos métodos de administração direta a pacientes, em algumas concretizações, os polipeptídeos variantes de IL2 podem ser usados em métodos *ex vivo*. Por exemplo, células (por exemplo, linfócitos de sangue periférico ou populações purificadas de linfócitos isoladas de um paciente e colocadas ou mantidas em cultura) podem ser cultivadas *in vitro* em meio de cultura e a etapa de contato pode ser afetada pela adição de polipeptídeos variantes de IL2, e / ou polinucleotídeos que os codificam para o meio de cultura. A etapa de cultura pode incluir outras etapas nas quais as células são estimuladas ou tratadas com outros agentes, por exemplo, para estimular a proliferação ou para expandir uma população de células que é reativa a um antígeno de interesse (por exemplo, um antígeno de câncer ou um antígeno viral). As células são então administradas ao paciente após terem sido tratadas.

[00288] O termo "doença" se refere a uma condição anormal que afeta o corpo de um indivíduo. Uma doença geralmente é interpretada como uma condição médica associada a sinais e sintomas específicos. Uma doença pode ser causada por fatores originários de uma fonte externa, como doenças infecciosas, ou pode ser causada por disfunções internas, como doenças autoimunes. Em humanos, "doença" é frequentemente usada de forma mais ampla para se referir a qualquer condição que causa dor, disfunção, angústia, problemas sociais ou morte para o indivíduo afetado, ou problemas semelhantes para aqueles em contato com o indivíduo. Nesse sentido mais amplo, às vezes inclui lesões, deficiências, distúrbios, síndromes, infecções, sintomas

isolados, comportamentos desviantes e variações atípicas de estrutura e função, enquanto em outros contextos e para outros fins, essas podem ser consideradas categorias distinguíveis. As doenças geralmente afetam os indivíduos não apenas fisicamente, mas também emocionalmente, pois contrair e conviver com muitas doenças pode alterar a perspectiva de vida e a personalidade.

[00289] No presente contexto, o termo "tratamento", "tratar" ou "intervenção terapêutica" se refere ao manejo e cuidado de um sujeito com o propósito de combater uma condição tal como uma doença ou distúrbio. O termo se destina a incluir o espectro completo de tratamentos para uma determinada condição da qual o sujeito está sofrendo, como a administração do composto terapeuticamente eficaz para aliviar os sintomas ou complicações, para atrasar a progressão da doença, distúrbio ou condição, para aliviar ou aliviar os sintomas e complicações e / ou curar ou eliminar a doença, distúrbio ou condição, bem como prevenir a condição, em que a prevenção deve ser entendida como o manejo e cuidado de um indivíduo com a finalidade de combater a doença ,

[00290] O termo "tratamento terapêutico" se refere a qualquer tratamento que melhora o estado de saúde e / ou prolonga (aumenta) a expectativa de vida de um indivíduo. O referido tratamento pode eliminar a doença em um indivíduo, interromper ou retardar o desenvolvimento de uma doença em um indivíduo, inibir ou retardar o desenvolvimento de uma doença em um indivíduo, diminuir a frequência ou gravidade dos sintomas em um indivíduo e / ou diminuir a recorrência

em um indivíduo que atualmente tem ou já teve uma doença.

[00291] Os termos "tratamento profilático" ou "tratamento preventivo" se referem a qualquer tratamento que se destina a prevenir a ocorrência de uma doença em um indivíduo. Os termos "tratamento profilático" ou "tratamento preventivo" são aqui usados indistintamente.

[00292] Os termos "indivíduo" e "sujeito" são usados aqui indistintamente. Eles se referem a um humano ou outro mamífero (por exemplo, camundongo, rato, coelho, cachorro, gato, gado, suíno, ovelha, cavalo ou primata) que pode ser afetado ou é suscetível a uma doença ou distúrbio (por exemplo, câncer), mas pode ou pode não ter a doença ou distúrbio. Em muitas concretizações, o indivíduo é um ser humano. Salvo indicação em contrário, os termos "indivíduo" e "sujeito" não denotam uma idade específica e, portanto, abrangem adultos, idosos, crianças e recém-nascidos. Em concretizações da presente divulgação, o "indivíduo" ou "sujeito" é um "paciente".

[00293] O termo "paciente" significa um indivíduo ou sujeito para tratamento, em particular um indivíduo ou sujeito doente.

[00294] Em uma concretização da divulgação, o objetivo é fornecer uma resposta imune contra células doentes que expressam um antígeno, como células cancerosas que expressam um antígeno tumoral, e tratar uma doença, como uma doença cancerosa envolvendo células que expressam um antígeno, como um antígeno tumoral.

[00295] Uma composição farmacêutica compreendendo RNA que codifica um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo

pode ser administrada a um sujeito para eliciar uma resposta imune contra um antígeno compreendendo o referido epítopo no sujeito que pode ser terapêutico ou parcialmente ou totalmente protetor. Um versado na técnica saberá que um dos princípios de imunoterapia e vacinação é baseado no fato de que uma reação imunoprotetora a uma doença é produzida pela imunização de um sujeito com um antígeno ou um epítopo, que é imunologicamente relevante em relação a doença a ser tratada. Consequentemente, as composições farmacêuticas aqui descritas são aplicáveis para induzir ou aumentar uma resposta imune. As composições farmacêuticas aqui descritas são, portanto, úteis no tratamento profilático e / ou terapêutico de uma doença envolvendo um antígeno ou epítopo.

[00296] Tal como aqui utilizado, "resposta imune" se refere a uma resposta corporal integrada a um antígeno ou uma célula que expressa um antígeno e se refere a uma resposta imune celular e / ou uma resposta imune humoral. Uma resposta imune celular inclui, sem limitação, uma resposta celular direcionada a células que expressam um antígeno e sendo caracterizada pela apresentação de um antígeno com molécula de MHC de classe I ou classe II. A resposta celular está relacionada aos linfócitos T, que podem ser classificados como células T auxiliares (também denominadas células T CD4 +) que desempenham um papel central regulando a resposta imune ou células assassinas (também denominadas células T citotóxicas, células T CD8 + ou CTLs) que induzem apoptose em células infectadas ou células cancerosas. Em uma concretização, a administração de uma composição farmacêutica da presente divulgação envolve a estimulação de

uma resposta de células T CD8 + antitumorais contra células cancerosas que expressam um ou mais antígenos tumorais. Em uma concretização específica, os antígenos tumorais são apresentados com molécula de MHC de classe I.

[00297] A presente divulgação contempla uma resposta imune que pode ser protetora, preventiva, profilática e / ou terapêutica. Tal como aqui utilizado, "induz [ou induzindo] uma resposta imune" pode indicar que nenhuma resposta imune contra um antígeno particular estava presente antes da indução ou pode indicar que havia um nível basal de resposta imune contra um antígeno particular antes da indução, que foi aumentado após a indução. Portanto, "induz [ou induz] uma resposta imune" inclui "aumenta [ou intensifica] uma resposta imune"¹.

[00298] O termo "imunoterapia" se refere ao tratamento de uma doença ou condição por meio da indução ou aumento de uma resposta imune. O termo "imunoterapia" inclui imunização com antígeno ou vacinação com antígeno.

[00299] Os termos "imunização" ou "vacinação" descrevem o processo de administração de um antígeno a um indivíduo com o propósito de induzir uma resposta imune, por exemplo, por razões terapêuticas ou profiláticas.

[00300] Os peptídeos, proteínas, polipeptídeos, RNA, partículas de RNA e outros agentes, por exemplo, inibidores de checkpoint imunológico, aqui descritos podem ser usados no tratamento terapêutico ou profilático de doenças em que o fornecimento de um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno em um sujeito ao referido sujeito resulta em um efeito

terapêutico ou profilático. Por exemplo, o fornecimento de um antígeno ou epítopo que é derivado de um vírus pode ser útil no tratamento de uma doença viral causada pelo referido vírus. O fornecimento de um antígeno tumoral ou epítopo pode ser útil no tratamento de uma doença cancerosa em que as células cancerosas expressam o referido antígeno tumoral.

[00301] Em uma concretização, a presente divulgação prevê concretizações, em que as formulações de RNA, tais como partículas de RNA lipoplex, como aqui descritas, direcionadas ao tecido do baço, são administradas. O RNA codifica, por exemplo, um peptídeo ou proteína compreendendo um epítopo conforme descrito, por exemplo, aqui. O RNA é captado por células apresentadoras de antígeno no baço, como células dendríticas, para expressar o peptídeo ou proteína. Após o processamento e apresentação opcionais pelas células apresentadoras de antígeno, uma resposta imune pode ser gerada contra o epítopo, resultando em um tratamento profilático e / ou terapêutico de uma doença envolvendo o epítopo ou um antígeno compreendendo o epítopo. Em uma concretização, a resposta imune induzida pelo RNA aqui descrito compreende a apresentação de um antígeno ou fragmento do mesmo, como um epítopo, por células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas e / ou macrófagos, e ativação de células T citotóxicas devido a essa apresentação. Por exemplo, os peptídeos ou proteínas codificadas pelos RNAs ou seus produtos de processamento podem ser apresentados por proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) expressas em células apresentadoras de antígeno. O complexo de peptídeo MHC pode

então ser reconhecido por células imunes, como células T ou células B, levando à sua ativação.

[00302] Consequentemente, a presente divulgação se refere a RNA como aqui descrito para uso em um tratamento profilático e / ou terapêutico de uma doença envolvendo um antígeno, de preferência, uma doença cancerígena.

[00303] O termo "macrófago" se refere a um subgrupo de células fagocíticas produzidas pela diferenciação de monócitos. Macrófagos que são ativados por inflamação, citocinas imunes ou produtos microbianos inespecificamente engolfam e matam patógenos estranhos dentro do macrófago por ataque hidrolítico e oxidativo resultando na degradação do patógeno. Os peptídeos de proteínas degradadas são exibidos na superfície das células macrófagos, onde podem ser reconhecidos pelas células T e podem interagir diretamente com os anticorpos na superfície das células B, resultando na ativação das células T e B e estimulação adicional da resposta imune. Os macrófagos pertencem à classe das células apresentadoras de antígenos. Em uma concretização, os macrófagos são macrófagos esplênicos.

[00304] O termo "célula dendrítica" (DC) se refere a outro subtipo de células fagocíticas pertencentes à classe das células apresentadoras de antígeno. Em uma concretização, as células dendríticas são derivadas de células progenitoras da medula óssea hematopoiéticas. Essas células progenitoras inicialmente se transformam em células dendríticas imaturas. Essas células imaturas são caracterizadas por alta atividade fagocítica e baixo potencial de ativação de células T. As células dendríticas

imaturas coletam amostras constantemente do ambiente circundante em busca de patógenos, como vírus e bactérias. Depois de entrarem em contato com um antígeno apresentável, eles se tornam ativados em células dendríticas maduras e começam a migrar para o baço ou para o linfonodo. As células dendríticas imaturas fagocitam patógenos e degradam suas proteínas em pequenos pedaços e, após a maturação, apresentam esses fragmentos em sua superfície celular usando moléculas de MHC. Simultaneamente, elas regulam positivamente os receptores da superfície celular que atuam como co-receptores na ativação das células T, como CD80, CD86 e CD40, aumentando muito sua capacidade de ativar as células T. Eles também regulam positivamente o CCR7, um receptor quimiotático que induz a célula dendrítica a viajar através da corrente sanguínea até o baço ou através do sistema linfático até um nódulo linfático. Aqui, elas agem como células apresentadoras de antígenos e ativam células T auxiliares e células T assassinas, bem como células B, apresentando-lhes antígenos, ao lado de sinais coestimulatórios não específicos do antígeno. Assim, as células dendríticas podem induzir ativamente uma resposta imune relacionada às células T ou B. Em uma concretização, as células dendríticas são células dendríticas esplênicas.

[00305] O termo "célula apresentadora de antígeno" (APC) é uma célula de uma variedade de células capaz de exibir, adquirir e / ou apresentar pelo menos um antígeno ou fragmento antigênico em (ou na) sua superfície celular. As células apresentadoras de antígeno podem ser distinguidas em células apresentadoras de antígeno profissionais e células

apresentadoras de antígeno não profissionais.

[00306] O termo "células de apresentação de antígeno profissionais" se refere a células de apresentação de antígeno que expressam constitutivamente as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II) necessárias para a interação com células T naíve. Se uma célula T interage com o complexo de moléculas MHC de classe II na membrana da célula apresentadora de antígeno, a célula apresentadora de antígeno produz uma molécula coestimuladora induzindo a ativação da célula T. As células apresentadoras de antígenos profissionais compreendem células dendríticas e macrófagos.

[00307] O termo "células de apresentação de antígeno não profissionais" se refere a células de apresentação de antígeno que não expressam constitutivamente moléculas de MHC de classe II, mas após estimulação por certas citocinas, tais como interferon-gama. Células apresentadoras de antígeno não profissionais exemplares incluem fibroblastos, células epiteliais do timo, células epiteliais da tireoide, células da glia, células beta pancreáticas ou células endoteliais vasculares.

[00308] "Processamento de antígeno" se refere à degradação de um antígeno em produtos de procissão, que são fragmentos do referido antígeno (por exemplo, a degradação de uma proteína em peptídeos) e a associação de um ou mais desses fragmentos (por exemplo, via ligação) com MHC moléculas para apresentação por células, como células apresentadoras de antígeno para células T específicas.

[00309] O termo "doença envolvendo um antígeno" ou

"doença envolvendo um epítopo" se refere a qualquer doença que implique um antígeno ou epítopo, por exemplo, uma doença que é caracterizada pela presença de um antígeno ou epítopo. A doença envolvendo um antígeno ou epítopo pode ser uma doença infecciosa ou uma doença cancerosa ou simplesmente câncer. Como mencionado acima, o antígeno pode ser um antígeno associado a uma doença, tal como um antígeno associado a tumor, um antígeno viral ou um antígeno bacteriano e o epítopo pode ser derivado de tal antígeno.

[00310] O termo "doença infecciosa" se refere a qualquer doença que pode ser transmitida de indivíduo para indivíduo ou de organismo para organismo, e é causada por um agente microbiano (por exemplo, resfriado comum). As doenças infecciosas são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, uma doença viral, uma doença bacteriana ou uma doença parasitária, cujas doenças são causadas por um vírus, uma bactéria e um parasita, respectivamente. A este respeito, a doença infecciosa pode ser, por exemplo, hepatite, doenças sexualmente transmissíveis (por exemplo, clamídia ou gonorreia), tuberculose, HIV / síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), difteria, hepatite B, hepatite C, cólera, respiratório agudo grave síndrome (SARS), a gripe aviária e influenza.

[00311] Os termos "doença de câncer" ou "câncer" se referem a ou descrevem a condição fisiológica em um indivíduo que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cânceres incluem, mas não estão limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Mais particularmente, exemplos de tais cânceres

incluem câncer ósseo, câncer de sangue, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer de ovário, câncer retal, câncer de anal região, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer uterino, carcinoma dos órgãos sexuais e reprodutivos, Doença de Hodgkin, câncer de esôfago, câncer de intestino delgado, câncer de sistema endócrino, câncer de glândula tireoide, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma dos tecidos moles, câncer da bexiga, câncer do rim, carcinoma de células renais, carcinoma da pelve renal, neoplasias do sistema nervoso central (SNC), câncer neuroectodérmico, tumores do eixo espinhal, glioma, meningioma e adenoma hipofisário. O termo "câncer", de acordo com a divulgação, também compreende metástases de câncer.

[00312] As estratégias de combinação no tratamento do câncer podem ser desejáveis devido a um efeito sinérgico resultante, que pode ser consideravelmente mais forte do que o impacto de uma abordagem monoterapêutica. Em uma concretização, a composição farmacêutica é administrada com um agente imunoterapêutico. Tal como aqui utilizado, "agente imunoterapêutico" se refere a qualquer agente que pode estar envolvido na ativação de uma resposta imune específica e / ou função (ões) efetoras imunes. A presente divulgação contempla o uso de um anticorpo como agente imunoterapêutico. Sem desejar ser limitado pela teoria, os anticorpos são capazes de alcançar um efeito terapêutico contra células cancerosas por meio de vários mecanismos,

incluindo indução de apoptose, bloqueio de componentes de vias de transdução de sinal ou inibição da proliferação de células tumorais. Em certas concretizações, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Um anticorpo monoclonal pode induzir a morte celular por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), ou ligar proteínas do complemento, levando à toxicidade celular direta, conhecida como citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Exemplos não limitativos de anticorpos anticâncer e potenciais alvos de anticorpos (entre colchetes) que podem ser usados em combinação com a presente divulgação incluem: Abagovomabe (CA-125), Abciximabe (CD41), Adecatumumabe (EpCAM), Afutuzumabe (CD20), Alacizumabe pegol (VEGFR2), Pentetato de Altumomabe (CEA), Amatuximabe (MORAb-009), Anatumomabe mafenizumab (T) 72 (HLA-DR), Arcitumomabe (CEA), Atezolizumabe (PD-L1), Bavituximabe (fosfatidilserina), Bectumomabe (CD22), Belimumabe (BAFF), Bevacizumabe (VEGF-A), Bivatuzinumabe mertansina (CD44 v6) 19), Brentuximabe vedotina (CD30 TNFRSF8), Cantuzumabe mertansina (mucina CanAg), Cantuzumabe ravnansina (MUC1), capromabe pendetide (células de carcinoma da próstata), Carlumabe (CNT0888), Catumaxomabe (EpCoxuma, CD3), Citatuzetuximab (ETCAM, CD3), Cita-Romab (EpCAM), Cixutumumabe (receptor IGF-1), Claudiximabe (Claudin), Clivatuzumabe tetraxetano (MUC1), Conatumumabe (TRAIL-R2), Dacetuzumabe (CD40), Dalotuzumabe (receptor do fator de crescimento semelhante à insulina I), Denosumabe (RANKL) , Detumomabe (célula de linfoma B), Drozitumabe (DR5), Ecomeximabe (gangliosídeo GD3), Edrecolomabe (EpCAM), Elotuzumabe (SLAMF7), Enavatuzumabe

(PDL192), Ensituximabe (NPC-1C), Epratuzumabe (CD22), Ertumaxomabe (HER2 / neu, CD3), Etaracizumabe (integrina $\alpha\text{v}\beta 3$), Farletuzumabe (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlatuzumabe (SCH 900105), Receptor Figitumumabe (IGF-1), Flanvotumabe (glicoproteína 75), Fresolimumabe (TGF- β), Galiximabe (CD80), Ganitumabe (IGF-I), Gemtuzumabe ozogamicina (CD33), Gevokizumabe (IL1 β), Girentuximabe (anidrase carbônica 9 (CA-IX)) Glembatumumabe vedotina (GPNMB), Ibritumomabe tiuxetano (CD20), Icrucumabe (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuximabe ravtansina (SDC1), Intetumumabe (CD51), Inotuzumabe ozogumabe (CD22at) 152, Ipilimumab (CD22at), Ipilimuma (CD30), Labetuzumabe (CEA), Lexatumumabe (TRAIL-R2), Libivirumabe (antígeno de superfície da hepatite B), Lintuzumabe (CD33), Lorvotuzumabe mertansina (CD56), Lucatumumabe (CD40), Lumiliximabe (CD23), Mapatumumabe (TRAIL-Rumabe), Matuzumabe (EGFR), Mepolizumabe (IL5), Milatuzumabe (CD74), Mitumomabe (gangliosídeo GD3), Mogamulizumabe (CCR4), Moxetumomabe pasudotox (CD22), Nacolomabe tafenatox (antígeno C242 (antígeno C242) esta, Natomafenato 5T4), Namatumabe (RON), Necitumumabe (EGFR), Nimotuzumabe (EGFR), Nivolumabe (IgG4), Ofatumumabe (CD20), Olaratumabe (PDGF-R a), Onartuzumabe (receptor de fator de dispersão humano quinase quinase), OportuzumaC monatoxAM, Oregovomabe (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3), Pentumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomab (adenocarcinoma antigen), Pritumumab (vimentin), Racotumomab (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab (Domínio B extra de fibronectina), Rafivirumab (glicoproteína do vírus da raiva), Ramucirumab (VEGFR2),

Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (IGF-1 receptor), Samalizumab (CD200), Sibrotuzumab (FAP), Siltuximab (IL6), Tabalumab (BAFF), Tacatuzumab tetraxetan (alfa-fetoproteína), Taplitumomab paptox (CD 19), Tenatumomab (tenascin C), Teprotumumab (CD221), Ticilimumab (CTLA-4), Tigatuzumab (TRAIL-R2), TNX-650 (IL13), Tositumomab (CD20), Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleukin (EpCAM), Ublituximab (MS4A1), Urelumab (4-1 BB), Volociximab (integrin $\alpha 5\beta 1$), Votumumab (tumor antigen CTAA 16.88), Zalutumumab (EGFR), and Zanolimumab (CD4).

[00313] A citação de documentos e estudos aqui referenciados não pretende ser uma admissão de que qualquer um dos itens anteriores é a técnica anterior pertinente. Todas as declarações quanto ao conteúdo destes documentos baseiam-se nas informações à disposição dos candidatos e não constituem qualquer admissão quanto à correcção do conteúdo dos mesmos.

[00314] A seguinte descrição é apresentada para permitir que um técnico versado no assunto faça e use as várias concretizações. Descrições de dispositivos, técnicas e aplicações específicas são fornecidas apenas como exemplos. Várias modificações nos exemplos descritos neste relatório descritivo serão prontamente aparentes para os técnicos versados no assunto, e os princípios gerais definidos neste relatório descritivo podem ser aplicados a outros exemplos e aplicações sem se afastar do espírito e escopo das várias concretizações. Assim, as várias concretizações não se destinam a ser limitadas aos exemplos

aqui descritos e mostrados, mas devem ter o escopo consistente com as reivindicações.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Projeto de construção e produção de mRNA

[00315] A transcrição *in vitro* de mRNAs que codificam citocinas foi baseada na estrutura do plasmídeo pST1-T7-AGA-dEarl-hAg-MCS-FI-A30LA70 e nas construções de DNA derivadas. Estas construções de plasmídeo contêm um 5' UTR (região não traduzida, um derivado de 5' -UTR da subunidade alfa 1 da hemoglobina homo sapiens (hAg)), um elemento 3'FI (onde F é um 136 nucleotídeo de comprimento 3'0 fragmento -UTR do intensificador do terminal amino de divisão, mRNA e I é um fragmento de 142 nucleotídeos de RNA 12S codificado mitocondrialmente, ambos identificados no Homo sapiens; WO 2017/060314) e uma cauda poli (A) de 100 nucleotídeos, com um ligante após 70 nucleotídeos. As sequências de codificação de citocina e albumina sérica (hAlb) originam-se do Homo sapiens e nenhuma alteração nas sequências de aminoácidos resultantes foi introduzida, exceto para as mutações pretendidas nas variantes mutLL2 descritas abaixo (hIL2: NP_000577.2; NCBI protein resource; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). O hAlb foi adicionado no terminal N ou C da variante de IL2 com ambas as orientações sendo igualmente eficazes *in vitro* e *in vivo* (dados não mostrados). As proteínas codificadas são equipadas com um peptídeo sinal N-terminal (SP) que é o PS nativo da respectiva proteína. No caso de proteínas de fusão, apenas o SP da porção N-terminal foi mantido, para outras porções apenas a porção madura (proteína sem SP) foi

codificada. Um códon de parada foi introduzido apenas para a porção mais C-terminal. Diferentes porções de proteína nas construções de fusão de citocina e hAlb foram separadas por uma sequência de ligação de 30 nucleotídeos que codifica para resíduos de glicina e serina. As mutações na sequência hL2 foram introduzidas para alterar a ligação de CD25 (chamadas de mutações "mutCD25", os respectivos construtos são chamados de hL2_Ax, com x sendo definido abaixo) e a ligação ao IL2R y (chamadas de mutações "mutpy", os respectivos construtos são marcados com um "s" adicional, por exemplo, hL2s ou hL2_A4s). No caso de hL2_A1 quatro substituições de resíduos de aminoácidos no domínio maduro foram introduzidas, a arginina na posição 38 foi alterada para alanina (R38A), a fenilalanina na posição 42 foi alterada para alanina (F42A), a tirosina na posição 45 foi alterada para alanina (Y45A) e o ácido glutâmico na posição 62 foi alterado para alanina (E62A) (Carmenate, T. et al. J. Immunol. 190, 6230-6238 (2013).). Para hL2_A2, as substituições de resíduos de aminoácidos do domínio maduro são K35A, K43A e E61A. Para hL2_A3 as substituições K35E, K43E e E61K foram introduzidas, para hL2_A4 K43E e E61K, para hL2_A5 E61 K e para hL2_A6 uma mutação E62K foi introduzida. Para a geração das variantes de hL2 mut y, os resíduos de aminoácidos do domínio maduro da respectiva variante de hL2 foram substituídos da maneira L80F, R81D, L85V, I86V e I92F (Levin, AM et al. Nature 484, 529-533 (2012)). O mRNA foi gerado por transcrição in vitro conforme descrito por Kreiter et al. (Kreiter, S. et al. Cancer Immunol. Immunother. 56, 1577-87 (2007)) com substituição da

uridina de nucleosídeo normal por 1-metil-pseudouridina. Os mRNAs resultantes foram equipados com uma estrutura Cap1 e as moléculas de fita dupla (dsRNA) foram esgotadas. O mRNA purificado foi eluído em H₂O e armazenado a -80 ° C até uso posterior. A transcrição in vitro de todas as construções de mRNA descritas foi realizada na BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH. Uma lista de todas as construções usadas em experimentos subsequentes é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de aminoácidos de proteínas codificadas e expressas de mRNA.

hAlb	MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRRDAHKSEVAH RFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGL
hAlb-hIL2	MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFRRDAHKSEVAH RFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT

hAlb- hIL2_A1	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHFRKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTAMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEALKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A2	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHFRKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPALTRMLTFAFYMPKKATELKHLQCLEAELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A3	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHFRKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL

	VAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPELTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEKELKPLEEVLNL AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A4	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHFRKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEKELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A5	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHFRKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEKELKPLEEVLNL AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A6	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHFRKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ

	NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEKLPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2s	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLN LAQSKNFHFDPRDVVSININVFLVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A4s	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEKELKPLEEVLN LAQSKNFHFDPRDVVSININVFLVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
hAlb- hIL2_A6s	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKF

	GERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLE CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQ NCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSK CCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKK LVAASQAALGLGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEKLPLEEVLN LAQSKNFHFDPRDVVSNNINVFVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
--	---

Exemplo 2: Expressão *in vitro* e ligação de L2R $\beta\gamma$ de variantes de IL2 codificadas por RNA

[00316] A expressão *in vitro* dos mRNAs gerados foi analisada por lipofecção do mRNA em células HEK293T / 17 e subsequente análise da ativação independente de CD25 de células repórter que expressam IL2R y pelas variantes de IL2 mutCD25 (Figura 1). Um dia antes da lipofecção, 1,2 X 10⁶ células HEK293T/17 foram semeadas em 3 ml de DMEM (Life Technologies GmbH, cat. N. 31966-021} + 10% de soro fetal de bovino (FBS, Biochrom GmbH, Cat. NO. S0115) em placas de 6 poços. Para lipofecção, 3 g de mRNA foi formulado sob condições estéreis e livres de RNase usando 400 ng de mRNA por μ L de Lipofectamine MessengerMax (Thermo Fisher Scientific, cat. No. LMRNA015) e aplicado por 10 cm² placa de cultura para as células HEK293T/17 em confluência de aproximadamente 80%. Após 20 h de expressão, os sobrenadantes foram coletados em condições estéreis e armazenados a -20° C até o uso posterior. A bioatividade dependente de IL2R $\beta\gamma$ das variantes IL2 mutCD25 foi avaliada medindo as respostas de proliferação específicas do receptor IL2 de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) que expressa células TF-1_IL2R $\beta\gamma$. Esta linhagem celular foi gerada a partir da

linhagem celular TF-1 (ATCC CRL-2003), uma linhagem celular eritroleucêmica humana que expressa naturalmente a cadeia γ -comum de IL2R, por transdução com vetor retroviral que codifica a sequência da cadeia IL2R β humana (Gene ID: 3560) análogo a Farner, NL et al. Blood 86, 4568-4578 (1995). Resumindo, as células TF-1_IL2R β γ foram lavadas duas vezes com D-PBS e ressuspensas em RPMI 1640 (Life Technologies GmbH, cat. No. 61870010) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Biochrom GmbH, cat. No. S01 15) e 1 mM de piruvato de sódio (Life Technologies GmbH, cat. No. 11360070). Um total de 5.000 células / poço foi semeado em placas brancas de fundo plano de 96 poços (Fisher Scientific GmbH, cat. N° 10072151) e foram incubados com diluições em série de quatro vezes de sobrenadantes contendo a variante IL2. Após três dias de cultura, a proliferação foi medida quantificando as células viáveis através da quantidade de ATP usando o Ensaio CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, cat. No. G9242). A luminescência foi registrada em um leitor Tecan Infinite® F200 PRO (Tecan Deutschland GmbH) e as curvas de dose-resposta foram plotadas no GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, Inc.).

Exemplo 3: Ligação de variantes de mutCD25 codificadas por RNA de IL2 a CD25 recombinante (IL2R α)

[00317] A ligação de variantes de mutCD25 de IL2 codificadas por mRNA a CD25 recombinante foi analisada por ELISA (Figura 2). Aqui, 1 μ g/mL de CD25 humano ou de camundongo recombinante (C-Fc, Novoproteína cat no. CJ78, CK32) foi revestido em 100 μ l de DPBS para placas de 96 poços de alta ligação a proteínas (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher

Scientific, cat. nº 439454). Os sobrenadantes contendo a variante de IL2 gerados por lipofecção de HEK-293-T-17 (como descrito no Exemplo 2) foram aplicados ao CD25 revestido e a proteína ligada foi detectada através de um anticorpo de albumina de soro anti-humano conjugado com HRP (Abeam, cat. No. ab8941). Os reagentes e procedimentos gerais de ELISA foram aplicados de acordo com o protocolo do DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems, cat. No. DY008).

[00318] O hAlb-hlL2 de tipo selvagem se ligou fortemente ao CD25 humano e de camundongo, conforme representado na Figura 2. Em termos de CD25 humano, a ligação foi completamente perdida para as variantes A1, A3, A4 e A6 de mutCD25, enquanto as variantes A2 e A5 mostraram alguma ligação residual para CD25 humano (Figura 2A). Em contraste, todas as variantes mutCD25 perderam a capacidade de se ligar ao CD25 de camundongo (Figura 2B).

Exemplo 4: Bioatividade de variantes de mutCD25 de IL2 codificadas por RNA na proliferação de CTLL-2 dependente de CD25.

[00319] A atividade biológica de variantes mutCD25 de IL2 foi avaliada por meio da análise da proliferação dependente de citocina de células CTLL-2 murinas (linhagem de células T de camundongo C57BL/6, ATCC TIB-214) que expressam CD25 altamente (Figura 3). Em suma, as células CTLL-2 foram colhidas, lavadas duas vezes com DPBS para remover qualquer IL2 residual e ressuspensas em RPMI 1640 (Life Technologies GmbH, cat. No. 61870010) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Biochrom GmbH, cat. no. S01 15) e piruvato de sódio 1 mM (Life Technologies GmbH, cat.

no. 11360070). Um total de 5.000 células / poço foram semeadas em placas brancas de 96 poços de fundo plano (Fisher Scientific GmbH, cat. N° 10072151) e incubadas com sobrenadantes contendo variante de IL2 diluída em série quatro vezes (como descrito no Exemplo 2). Após três dias de cultura, a proliferação foi medida quantificando as células viáveis através da quantidade de ATP usando o Ensaio CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, cat. No. G9242). A luminescência foi registrada em um leitor Tecan Infinite® F200 PRO (Tecan Deutschland GmbH) e as curvas de dose-resposta foram plotadas no GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, Inc.).

[00320] O hAlb-hlL2 de tipo selvagem induziu a proliferação de células CTLL-2 de um modo dependente da dose com uma concentração eficaz metade máxima (EC50) de 0,2144% do sobrenadante (Figura 3). As variantes A2 e A5 de mutCD25 tiveram desempenho semelhante ao hAlb-hlL2 de tipo selvagem, também refletido pelos valores de EC50 variando entre 0,1933% do sobrenadante e 0,2127% do sobrenadante, respectivamente. Em contraste, as variantes A1 de IL2 mostraram uma variação de aprox. Diminuição de 1000 vezes no valor de EC50, resultando em ser quase desprovido de qualquer atividade biológica nas células CTLL-2. As variantes A3, A4 e A6, no entanto, induziram a proliferação de células CTLL-2 com valores de EC50 variando entre 15,10% de sobrenadante para A3, 1,43% de sobrenadante para A4 e 7,785% de sobrenadante para A6, apresentando, assim, atividade biológica intermediária que é aproximadamente 50 vezes menor em comparação com hAlb-hlL2 de tipo selvagem (Figura

3).

Exemplo 5: Bioatividade de variantes de IL2 codificadas por RNA na proliferação de PBMC humano.

[00321] A fim de medir a proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), as PBMCs foram incubadas com uma concentração sub-ótima de anticorpo anti-CD3 (clone UCHT1) e sobrenadantes derivados de lipofecções de HEK293T / 17 com mRNA que codifica variantes de IL2 ou sobrenadantes de controle. Resumindo, os PBMCs foram obtidos de camadas leucocitárias de doadores saudáveis por separação por gradiente de densidade Ficoll-Paque (VWR internacional, cat. No. 17-1440-03). PBMCs foram marcados usando éster succinimidílico de carboxifluoresceína 1,6 mM (CFSE; Thermo Fisher, cat. No. C34564). 75.000 PBMCs marcados com CFSE foram semeados por poço em uma placa de fundo redondo de 96 poços (Costar, cat. No. 734-1797) em Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Life Technologies GmbH, cat. No. 12440-053) suplementado com 5% de soro humano derivado de plasma (PHS; One Lambda Inc., cat. no. A25761) e incubado com uma concentração sub-ótima de anticorpo anti-CD3 (clone UCHT1; R&D Systems, n° cat. MAB100; concentração final de 0,03-0,09 g/mL) que foi pré-determinada para cada doador. Em paralelo, diluições em série de quatro vezes de sobrenadantes contendo variantes de IL2 (ver Exemplo 2) foram geradas em IMDM suplementado com 5% de PHS. As células semeadas foram misturadas 1:1 (referindo-se ao volume do meio de cultura das células semeadas) com sobrenadantes da variante de IL2 e estimuladas por quatro dias a 37 ° C, 5% de CO₂. PBMCs foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo. As

células foram coradas com os seguintes reagentes, todos diluídos 1:100 em tampão FACS (D-PBS contendo 5% de FBS e 5 mM de EDTA): anti-CD4-PE humano (TONBO Bioscience, cat. 50-0049), anti-humano CD8- PE (TONBO Bioscience, cat. 50-0088), anti-humano CD56-APC (eBioscience, cat. No. 17-0567-42) e 7-AAD (Beckman Coulter, cat. No. A07704). A análise de citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) com diluição CFSE como leitura de proliferação. Os dados de proliferação adquiridos foram analisados usando o software FlowJo 10.4 e os valores do índice de expansão exportados foram usados para traçar as curvas de dose-resposta no GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, Inc.).

[00322] Além das variantes hAlb-hlL2_A2 e hAlb-hlL2_A5, que tiveram desempenho idêntico à IL2 de tipo selvagem em ensaios de proliferação de CTLL-2 dependentes de **IL2R $\alpha\beta\gamma$** de alta afinidade, todos os outros mutantes foram analisados em um ensaio de proliferação inespecífico de antígeno com PBMCs humanos em massa. O hAlb-hlL2 de tipo selvagem mostrou atividade biológica superior em comparação com todas as outras variantes de IL2 por aumentar fortemente a proliferação induzida por CD3 de células T CD4+ (Figura 4A), células T CD8+ (Figura 4B), bem como células NK CD56+ (Figura 4C). Todas as variantes testadas com capacidade de ligação de CD25 diminuída exibiram um fenótipo intermediário. As variantes hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6 tiveram desempenho comparável com aprox. Redução de 50 vezes na potência em comparação com hAlb-hlL2 de tipo selvagem, enquanto hAlb-hlL2_A1 e hAlb-hlL2_A3 mostraram

curvas de dose-resposta sobrepostas com uma mudança ainda mais forte em direção à atividade biológica diminuída, ou seja, aprox. Bioatividade 75 vezes menor do que hAlb-hlL2. As diferenças observadas para as variantes descritas foram comparáveis entre todos os três subconjuntos de linfócitos avaliados, mas a proliferação de células NK foi em geral menos pronunciada do que a proliferação de células T.

[00323] hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6 com fenótipo intermediário foram ainda comparados com variantes contendo adicionalmente as mutações mut $\beta\gamma$ que foram descritas para aumentar a ligação ao complexo IL2R $\beta\gamma$ (ver também Exemplo 1). Em ambas as células T CD4+ e CD8+, o hAlb-hlL2 exibiu atividade biológica superior que não foi reforçada pela adição das mutações mut $\beta\gamma$, também refletido nos valores de EC50 calculados (Tabela 2). A variante mutCD25 hAlb-hlL2_A4 mostrou uma diminuição na atividade biológica de aprox. 50 vezes nas células T CD4+ e 100 vezes nas células T CD8+ em comparação com hAlb-hlL2. A potência da outra variante mutCD25 hAlb-hlL2_A6 foi, em comparação com hAlb-hlL2_A4, ainda mais 2 vezes reduzida em ambos os subconjuntos de células T. A adição das mutações mut $\beta\gamma$, no entanto, aumentou a atividade biológica de ambas as variantes mutCD25 (ou seja, hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6) em células T CD4+ e CD8+, como consequência, resultando em uma bioatividade diminuída de apenas 4 a 7 vezes de hAlb-hlL2_A4s e uma bioatividade diminuída de 9 a 16 vezes de hAlb-hlL2_A6s em comparação com hAlb-hlL2 e hAlb-hlL2s (Figura 4D e E, Tabela 2). Em células NK CD56+, a variante mut $\beta\gamma$ hAlb-hlL2s exibiu bioatividade

mais elevada, excedendo ligeiramente a atividade biológica de hAlb-hlL2 de tipo selvagem (valores de EC50 de 0,6084 e 1,662% do sobrenadante, respectivamente, ver Tabela 2). Em contraste com as células T CD4+ e CD8+, em células NK CD56+ a potência das variantes mutCD25 hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6 foi apenas 3-8 vezes reduzida em comparação com hAlb-hlL2. A adição das mutações mut $\beta\gamma$ a hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6 restaurou a atividade biológica das variantes hAlb-hlL2_A4s e hAlb-hlL2_A6s ao nível de hAlb-hlL2 de tipo selvagem (Figura 4 F).

Tabela 2: Valores de EC50 [% de sobrenadante] das variantes de hAlb-hlL2 em subconjuntos de linfócitos de PBMC inteiros derivados de respostas de dose de proliferação de PBMC humano.

Variante IL2	Células T CD4+	Células T CD8+	Células NK CD56+
hAlb-hIL2	0,5455	0,1524	1,662
hAlb-hIL2s	0,5414	0,4578	0,6084
hAlb-hIL2_A4	n.d.	14,06	5,472
hAlb-hIL2_A4s	3,801	1,701	0,5326
hAlb-hIL2_A6	n.d.	n.d.	13,64
hAlb-hIL2_A6s	8,883	4,317	1,617

Exemplo 6: Comparação da bioatividade relativa de diferentes variantes de IL2 no receptor de IL2 de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) versus o receptor de IL2 de alta afinidade (IL2R $\alpha\beta\gamma$) que expressa linhagens de células repórter dependentes de IL2.

[00324] Para dissecar o papel da cadeia IL2R α (CD25) como um determinante para a atividade biológica das

diferentes variantes de IL2, as respostas de proliferação específicas da linhagem de células T de camundongo que expressa o receptor de IL2 de alta afinidade (IL2R $\alpha\beta\gamma$) CTLL-2 foram comparadas para o receptor IL2 de afinidade intermediária (IL2R $\beta\gamma$) que expressa células TF-1_IL2R $\beta\gamma$, uma linhagem celular eritroleucêmica humana que expressa naturalmente a cadeia γ comum de IL2R sendo transduzida para também expressar a cadeia IL2R β (ver exemplo 2). Em suma, as células CTLL-2 e TF-1_IL2R $\beta\gamma$ foram lavadas duas vezes com D-PBS e ressuspensas em RPMI 1640 (Life Technologies GmbH, n° cat. 61870010) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Biochrom GmbH, cat. No. S01 15) e piruvato de sódio 1 mM (Life Technologies GmbH, cat. No. 11360070). Um total de 5.000 células / poço foi semeado em placas brancas de fundo plano de 96 poços (Fisher Scientific GmbH, cat. N° 10072151) e foram incubados com cinco diluições em série de quatro vezes de sobrenadantes contendo variante de IL2 (como descrito no Exemplo 2). Após três dias de cultura, a proliferação foi medida quantificando as células viáveis através da quantidade de ATP usando o Ensaio CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, cat. No. G9242). A luminescência foi registrada em um leitor Tecan Infinite® F200 PRO (Tecan Deutschland GmbH) e as curvas de dose-resposta foram plotadas, bem como os valores de EC50 calculados no GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, Inc.).

[00325] hAlb-hIL2, bem como as variantes de hAlb-hIL2 mutCD25 com afinidade de ligação de CD25 reduzida (isto é, hAlb-hIL2_A4 e _A6) realizada no par em células TF-1_IL2R $\beta\gamma$ -expressando IL2R $\beta\gamma$ independentes de CD25 com curvas dose-

resposta quase sobreponíveis (Figura 5A , B). Isso também se reflete nos valores de EC50 calculados, variando de 2,352% do sobrenadante para hAlb-hIL2 a 3,657% do sobrenadante para hAlb-hIL2_A6 (Tabela 3). Além disso, as variantes mut $\beta\gamma$ com afinidade de ligação aumentada para IL2R β (ou seja, hAlb-hIL2s, hAlb-hIL2_A4s, hAlb-hIL2_A6s) mostraram uma mudança de 10-30 vezes em direção ao aumento da atividade biológica, conforme esperado com valores EC50 comparáveis para hAlb-hIL2s e hAlb-hIL2_A4s (0,080 e 0,107% do sobrenadante, respectivamente), bem como uma atividade ligeiramente inferior de hAlb-hIL2_A6s (EC50 = 0,338% do sobrenadante). Em notável contraste, fortes diferenças entre as variantes de hAlb-hIL2 e hAlb-hIL2 podem ser vistas em culturas de CTLL-2 que expressam IL2R $\alpha\beta\gamma$ dependentes de CD25 (Figura 5C, D). Aqui, hAlb-hIL2 exibiu a atividade biológica mais elevada que não poderia ser ainda mais reforçada pela adição das mutações mut $\beta\gamma$ (Tabela 4; EC50 de 0,115 vs. 0,240% de sobrenadante para hAlb-hIL2 e hAlb-hIL2s). Em comparação com hAlb-hIL2, a atividade de hAlb-hIL2_A4 foi reduzida em aprox. 19 vezes (EC50 = 2,19% sobrenadante) enquanto que para hAlb-hIL2_A6 foi reduzido aprox. 300 vezes (EC50 = 33,72% sobrenadante). As variantes mut $\beta\gamma$ correspondentes, hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s, mostraram uma atividade biológica aumentada, mas ainda eram menos ativas do que hAlb-hIL2 com valores de EC50 de 0,517 e 1,575, respectivamente).

Tabela 3: Valores de EC50 [% de sobrenadante] das variantes de hAlb-hIL2 em cultura de células dependentes do receptor IL2 de afinidade intermediária (IL2R γ) derivada de respostas à dose de proliferação TF-1_IL2R $\beta\gamma$ humana. Foram calculadas

as razões para obter dados de redução e aumento de vezes de EC50 em comparação com hAlb-hIL2.

Variante IL2	EC50	EC50 redução de vezes sobre hAlb- hIL2	EC50 aumento de vezes sobre hAlb- hIL2
hAlb-hIL2	2,352	–	–
hAlb-hIL2s	0,080	29,400	0,034
hAlb-hIL2_A4	3,304	0,712	1,405
hAlb-hIL2_A4s	0,107	21,981	0,045
hAlb-hIL2_A6	3,657	0,64	1,555
hAlb-hIL2_A6s	0,338	6,96	0,144

Tabela 4: Valores de EC50 [% de sobrenadante] das variantes de hAlb-hIL2 em receptor de IL2 de alta afinidade (IL2R $\alpha\beta\gamma$) – cultura de células dependente derivada de respostas à dose de proliferação de CTLL-2 de camundongo. Foram calculadas as razões para obter dados de redução e aumento de vezes de EC50 em comparação com hAlb-hIL2.

Variante IL2	EC50	EC50 redução de vezes sobre hAlb- hIL2	EC50 aumento de vezes sobre hAlb- hIL2
hAlb-hIL2	0,115	–	–
hAlb-hIL2s	0,240	0,480	2,087
hAlb-hIL2_A4	2,190	0,050	19,043
hAlb-hIL2_A4s	0,517	0,220	4,496
hAlb-hIL2_A6	33,720	0,003	293,217
hAlb-hIL2_A6s	1,575	0,073	13,696

Exemplo 7: Comparação da atividade de variantes de hAlb-hIL2 em diferentes subconjuntos de células T em PBMCs humanos usando fosforilação STAT5 como leitura.

[00326] Para avaliar a atividade de variantes de hAlb-hIL2 em diferentes subconjuntos de células T que eram deficientes ou expressos em CD25, PBMCs humanos inteiros foram estimulados com variantes de hAlb-hIL2 e testados para fosforilação de STAT5 em uma gama de diluições de citocinas. Resumindo, os PBMCs foram obtidos de camadas leucocitárias de doadores saudáveis por separação por gradiente de densidade Ficoll-Paque (VWR internacional, cat. No. 17-1440-03). PBMCs foram lavados duas vezes com D-PBS (Life Technologies GmbH, cat. No. 14190250) e coletados por centrifugação por 5 min, 300 × g em temperatura ambiente. PBMCs foram ressuspensos em meio de Dulbecco modificado de lscove (IMDM; Life Technologies GmbH, cat. N° 12440-053) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Biochrom GmbH, cat. N° S0115) e foram repousados por 1 h a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, 100.000 PBMCs foram semeados por poço de uma placa de fundo em V de 96 poços (Greiner Bio-One GmbH, cat. N° 651101) em IMDM suplementado com FBS a 10% e inibidor de fosfatase PhosSTOP™ 2 vezes (Sigma-Aldrich, cat. n.º 04906845001). Em paralelo, cinco diluições em série de quatro vezes de sobrenadantes contendo a variante hAlb-hIL2 (como descrito no Exemplo 2) foram geradas em IMDM suplementado com FBS a 10%. As células semeadas foram misturadas 1:1 (referindo-se ao volume do meio de cultura das células semeadas) com sobrenadantes da variante hAlb-hIL2 e estimuladas por 10 min a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, o

corante de viabilidade fixável 1:1.000 e Fluor™ 780 foi adicionado e as células estimuladas por mais 5 min a 37° C e 5% de CO₂. As células foram fixadas por adição de formaldeído (Carl Roth GmbH + Co. KG, cat. No. P087.4) a 2% e incubadas por 10 min em gelo. PBMCs fixos foram lavados com D-PBS gelado e permeabilizados com metanol 100% gelado por 30 min em gelo. PBMCs permeabilizados foram lavados duas vezes com tampão de permeabilização 1 vez (eBioscience Inc., cat. No. 00-8333-56) e subsequentemente corados com 1:5 Alexa Fluor® 488 Anti-Stat5 (pY694) (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 612598), 1:25 PerCP-Cy™ 5.5 Mouse anti-humano CD25 (Becton Dickinson GmbH, cat. no. 560503), 1:25 APC Rat anti FOXP3 (eBioscience Inc., 17-4776-41), 1:25 BV421 CD4 anti-humano de camundongo (Becton Dickinson GmbH, n° cat. 565997), e CD8 anti-humano de camundongo 1:25 BV510 (Becton Dickinson GmbH, n° cat. 563256) em tampão de permeabilização 1 vez por 30 min a 2-8 ° C protegido da luz. PBMCs corados foram lavados duas vezes com tampão de permeabilização 1 vez resfriado em gelo e finalmente ressuspensos em D-PBS suplementado com 2% de FBS e 2 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, cat. No. 03690-100ML). A análise de citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson GmbH) e os dados adquiridos foram analisados usando o software FlowJo versão 10.3. As curvas de dose-resposta e os valores de EC₅₀ foram calculados no GraphPad Prism versão 6.04 (GraphPad Software, I, Inc.).

[00327] Em células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ hAlb-hIL2 exibiu potência superior sobre todas as variantes IL2 mutCD25 com afinidade de ligação CD25 reduzida (hAlb-

hIL2_A4 / _A6), bem como as respectivas variantes mut $\beta\gamma$ (hAlb-hIL2_A4s, hAlb-hIL2_A6s) (Figura 6 e Tabelas 5,6). Em detalhes, a atividade biológica de hAlb-hIL2_A6 foi fortemente reduzida em ~ 320 vezes em comparação com hAlb-hIL2, enquanto hAlb-hIL2_A4 exibiu um fenótipo intermediário (atividade reduzida de ~ 170 vezes em comparação com hAlb-hIL2). A bioatividade de ambas as variantes mutCD25 foi reforçada pela adição de mutações mut $\beta\gamma$ com hAlb-hIL2_A4s sendo superior a hAlb-hIL2_A6s mostrando uma atividade reduzida de ~ 6 vezes e ~ 21 vezes em comparação com hAlb-hIL2, respectivamente. A variante mais ativa foi hAlb-hIL2s com sua atividade biológica sendo ainda aumentada em ~ 15 vezes em comparação com hAlb-hIL2. Na ausência de expressão de CD25, a potência de hAlb-hIL2 foi fortemente reduzida em > 40 vezes (ver Figura 6, Tabela 5, células T auxiliares CD4+ CD25- e células T citotóxicas CD8+ em comparação com CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg), no entanto, ainda era superior às variantes de mutCD25 hAlb-hIL2_A4 e hAlb-hIL2_A6. O mesmo também é verdadeiro para a mutação mut $\beta\gamma$ correspondente contendo variantes: hAlb-hIL2s exibiu a maior atividade biológica em subconjuntos de células T CD4+ e CD8+ CD25-negativas (ver Tabelas 7 - 8; potência aumentada de ~ 5 - 10 vezes em comparação com hAlb-hIL2) seguido por hAlb-hIL2_A4s, que atua no mesmo nível de hAlb-hIL2 em células T auxiliares CD4+ CD25- e foi ainda superior a hAlb-hIL2 em células T citotóxicas CD8+ (ver Tabelas 7 - 8; aumento de ~ 2 vezes atividade biológica em comparação com hAlb-hIL2). Quando comparado com hAlb-hIL2_A4s, hAlb-hIL2_A6s vem com atividade biológica ligeiramente reduzida, ainda com

desempenho quase tão bom quanto hAlb-hIL2 em células T citotóxicas CD8+, mas sendo menos ativo em células T auxiliares CD4+ CD25-. Mais importante ainda, usando a proporção de valores de EC50 determinados por variante individual de hAlb-hIL2 em células T auxiliares CD4+ CD25- ou células T citotóxicas CD8+ versus valores de EC50 determinados em células T regulatórias CD4+ CD25+ FoxP3+ (Tabela 5) permite calcular a 'polarização de células T regulatórias' de cada variante de hAlb-hIL2 (Tabela 9). hAlb-hIL2 exibe um viés de 40-60 vezes para células T regulatórias CD4+ CD25+ FoxP3+ em comparação com sua potência em células T auxiliares CD4 + CD25- ou células T citotóxicas CD8+. Em notável contraste, esta tendência de células T regulatórias é reduzida para apenas 1,2-1,9 vezes quando se olha para as variantes mutCD25 hAlb-hIL2_A4 e hAlb-hIL2_A6. As variantes mut $\beta\gamma$ correspondentes hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s vêm com uma tendência de célula T reguladora ligeiramente aumentada de 4,4 - 7,1 vezes. hAlb-hIL2s mostra a tendência mais forte de 63-182 vezes em direção às células T regulatórias CD4+ CD25+ FoxP3+ quando comparada à sua potência em células T auxiliares CD4 + CD25- ou células T citotóxicas CD8+.

Tabela 5: Valores de EC50 [% de sobrenadante] calculados com base na resposta à dose de fosforilação de STAT5 para as variantes de hAlb-hIL2 em diferentes subconjuntos de células T humanas.

Variante IL2	CD4+CD25+FoxP3+T reg	Células T help CD4+CD25- T	Células T citotóxicas CD8+
hAlb-hIL2	0.111	4,356	6,845

hAlb-hIL2s	0,007	0,4442	1,275
hAlb-hIL2_A4	18,49	35,39	33,76
hAlb-hIL2_A4s	0,680	3,967	3,021
hAlb-hIL2_A6	35,93	51,69	44,75
hAlb-hIL2_A6s	2,343	16,75	14,62

Tabela 6: Valores de EC50 [% de sobrenadante] calculados com base na resposta à dose de fosforilação STAT5 para as variantes de hAlb-hIL2 em células T reguladoras CD4+ CD25+ FoxP3+ humanas. São calculadas as razões para obter dados de redução e aumento de vezes de EC50 em comparação com hAlb-hIL2.

Variante IL2	EC50	EC50 redução de vezes sobre hAlb-hIL2	EC50 aumento de vezes sobre hAlb-hIL2
hAlb-hIL2	0,111	–	–
hAlb-hIL2s	0,007	15,850×	0,063×
hAlb-hIL2_A4	18,49	0,006×	166,577×
hAlb-hIL2_A4s	0,680	0,163×	6,126×
hAlb-hIL2_A6	35,93	0,003×	323,694×
hAlb-hIL2_A6s	2,343	0,047×	21,108×

Tabela 7: Valores de EC50 [% de sobrenadante] calculados com base na resposta à dose de fosforilação STAT5 para as

variantes de hAlb-hIL2 em células T auxiliares CD4 + CD25-T humanas. São calculadas as razões para obter dados de redução e aumento de vezes de EC50 em comparação com hAlb-hIL2.

Variante IL2	EC50	EC50 redução de vezes sobre hAlb-hIL2	EC50 aumento de vezes sobre hAlb-hIL2
hAlb-hIL2	4,356	–	–
hAlb-hIL2s	0,4442	9,806×	0,102×
hAlb-hIL2_A4	35,39	0,123×	8,124×
hAlb-hIL2_A4s	3,967	1,090×	0,911×
hAlb-hIL2_A6	51,69	0,084×	11,866×
hAlb-hIL2_A6s	16,75	0,260×	3,845×

Tabela 8: Valores de EC50 [% de sobrenadante] calculados com base na resposta à dose de fosforilação STAT5 para as variantes de hAlb-hIL2 em células T citotóxicas CD8+ humanas. São calculadas as razões para obter dados de redução e aumento de vezes de EC50 em comparação com hAlb-hIL2.

Variante IL2	EC50	EC50 redução de vezes sobre hAlb-hIL2	EC50 aumento de vezes sobre hAlb-hIL2
hAlb-hIL2	6,845	–	–
hAlb-hIL2s	1,275	5,369×	0,186×
hAlb-hIL2_A4	33,76	0,203×	4,932×
hAlb-hIL2_A4s	3,021	2,265×	0,441×
hAlb-hIL2_A6	44,75	0,153×	6,538×

hAlb-hIL2_A6s	14,62	0,468×	2,136×
---------------	-------	--------	--------

Tabela 9: A 'tendência de células T regulatórias' de cada variante de hAlb-hIL2 é dada como potência reduzida em células T auxiliares CD4 + CD25- ou células T citotóxicas CD8 + em comparação com células T reguladoras CD4 + CD25 + FoxP3 +. A potência reduzida foi calculada como a razão dos valores de EC50 individuais para cada variante de hAlb-hIL2 determinada em células T auxiliares CD4 + CD25- ou células T citotóxicas CD8 + versus os valores de EC50 determinados em células T reguladoras CD4+ CD25+ FoxP3+.

Variante IL2	Efeito de vezes-reduzido em células T help CD4+CD25- vs. T_{reg}	Efeito de vezes-reduzido em células T citotóxica CD8+ vs. T_{reg}
hAlb-hIL2	39×	62×
hAlb-hIL2s	63×	182×
hAlb-hIL2_A4	1,9×	1,8×
hAlb-hIL2_A4s	5,8×	4,4×
hAlb-hIL2_A6	1,4×	1,2×
hAlb-hIL2_A6s	7,1×	6,2×

Exemplo 8: Efeitos de variantes IL2 mutCD25 na vacinação de células T *in vivo*

[00328] Posteriormente, caracterizamos o efeito das variantes de IL2 mutCD25 hIL2_A4 e hIL2_A6 nas respostas de células T induzidas pela vacina de RNA *in vivo*. Camundongos BALB/c (n = 5 por grupo) foram vacinados i.v. com 20 g de RNA-LPX que codifica o CD8 +O antígeno de células T gp70 (SPSYAYHQF) conforme descrito em Kranz, LM et al. Nature 534, 396-401 (2016). Gp70 é um antígeno tumoral que pode ser

encontrado, por exemplo, na linhagem de células CT26 de carcinoma do cólon. A eficácia antitumoral de uma vacina direcionada a gp70 aumenta com o aumento do número de células T específicas de gp70 induzidas (Kranz, LM et al. Nature 534, 396-401 (2016) e não publicado). Três dias após a vacinação, hAlb (controle negativo) ou doses crescentes de hAlb-hlL2, hAlb-hlL2_A4, hAlb-hlL2_A6 RNA formulado como LNPs foram administrados i.v. conforme representado na Figura 7. No dia 7 análises incluindo imunofenotipagem de subconjuntos de linfócitos sanguíneos e gp70 células T específicas (MHC tetrâmero, MBL) via citometria de fluxo (BD FACSCelesta) foram realizadas (coloração conforme descrito em Kranz, LM et al. Nature 534, 396 - 401 (2016)).

[00329] Conforme descrito no Exemplo 4 e Exemplo 6, as variantes de mutCD25 têm uma potência reduzida para estimular células CTLL-2 positivas para IL2R $\alpha\beta\gamma$. Por esta razão, testamos doses aproximadamente três vezes maiores de variantes mutCD25 do que hAlb-hlL2 de tipo selvagem para ser capaz de induzir efeitos comparáveis em células T efetoras específicas de gp70 como hAlb-hlL2 enquanto melhora as razões de CD8 para Treg. Apesar de doses mais elevadas, apenas hAlb-hlL2, mas não as variantes de hAlb-hlL2 mutCD25 mostraram um aumento significativo no peso do fígado como indicador de toxicidade mediada por IL2 (Figura 7B). Da mesma forma, nenhum aumento da atividade sérica de Aspartat-Aminotransferase (ASAT) (Figura 7C), Alanina-Aminotransferase, Lactato-Desidrogenase, Amilase ou Lipase (Indiko TM, Thermo Fischer Scientific), bem como o peso do pulmão (dados não mostrados). O hAlb-hlL2 de tipo selvagem,

bem como as variantes de hAlb-hlL2 mutCD25 resultaram em um aumento dependente da dose de células T específicas de gp70 no sangue, conforme determinado por citometria de fluxo com o reforço mais forte observado com a dose mais alta de hAlb-hlL2_A4 e o reforço mais fraco com hAlb-hlL2_A6 (Figura 7D). Curiosamente, especialmente hAlb-hlL2_A4 resultou em um aumento muito forte de células T CD8 +, bem como de leucócitos CD45 + (Figura 7E, F). Em comparação com hAlb-hlL2 e hAlb-hlL2_A4, a administração de hAlb-hlL2_A6 não resultou em aumento de Tregs (Figura 7G). É importante notar que ambas as variantes de hAlb-hlL2 mediaram um aumento da razão de células T CD8 + para Treg, demonstrando a expansão preferencial de células T CD8 + sobre as Tregs promotoras de tumor (Figura 7H). Em comparação, o hAlb-hlL2 reduziu a proporção de células T CD8 + para Treg de uma maneira dependente da dose. Ao comparar a mudança de dobra de células T CD8 + específicas para gp70 ou não específicas sobre o controle de hAlb, hAlb-hlL2 e hAlb-hlL2_A4, mas não hAlb-hlL2_A6, levam a uma expansão preferencial de células T específicas de gp70 (Figura 7I). Tomados em conjunto, estes resultados indicam que as variantes hAlb-hlL2_A6 e hAlb-hlL2_A4 não têm ou têm capacidade de ligação de CD25 reduzida levando a efeitos benéficos para a imunoterapia do câncer, como um aumento na razão de células T CD8+ para Treg.

Exemplo 9: Melhoria da eficácia da variante IL2 mutCD25 por adição de mutações mut $\beta\gamma$.

[00330] Embora as variantes hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6 aumentassem fortemente a razão de células T CD8+ para Treg, uma forte expansão de células T específicas do

antígeno exigiu doses muito mais altas em comparação com hAlb-hlL2 devido à ligação reduzida à alta afinidade IL2R $\alpha\beta\gamma$ em células T ativadas. Assim, testamos se a potência de hAlb-hlt_2_A4 e hAlb-hlL2_A6 *in vivo* poderia ser melhorada pela introdução de mutações mut $\beta\gamma$ que mostraram melhorar a ligação a todas as células positivas para IL2R $\beta\gamma$ *in vitro* (Exemplos 5-7; Levin, AM et al. Nature 484, 529-533 (2012)). Como para o Exemplo 8, camundongos BALB / c (n = 5 por grupo) foram vacinados iv com 20 g de gp70 RNA-LPX seguido três dias mais tarde por injeção de citocina RNA-LNP (Figura 7A). Neste experimento, reduzimos drasticamente as doses de citocina RNA-LNP para garantir que as melhorias por mutações de mut $\beta\gamma$ fossem bem cobertas e para testar os limites inferiores da dose de tratamento. Sete dias após a vacinação, células T específicas para gp70, células NK, bem como Tregs CD25 FoxP3 positivas foram analisadas (Figura 8).

[00331] Como mostrado no Exemplo 8, as frequências de células T e Treg específicas do antígeno foram aumentadas pela administração de hAlb-hlL2_A4, mas não de hAlb-hlL2_A6 (Figura 8A, B). Surpreendentemente, ambas as mutações hTuíbg contendo as variantes hAlb-hlL2_A4s e hAlb-hlL2_A6s aumentaram ainda mais as frequências de células T específicas do antígeno sem qualquer aumento detectável de frequências Treg (ou contagens de células, dados não mostrados). hAlb-hlL2_A4s e hAlb-hlL2_A6s levaram a um aumento preferencial de antígeno específico sobre células T CD8 não específicas que excederam o de hAlb-hlL2_A4 e hAlb-hlL2_A6 (Figura 8C). Além disso, todas as construções expandiram fortemente as frequências de células NK (e contagens, dados não

mostrados) até quase 50% dos linfócitos periféricos (Figura 8D). Aqui, hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s mostraram eficácia semelhante a hAlb-hIL2_A4 em altas doses, mas superioridade em doses mais baixas. Em resumo, isso mostra que as mutações mut $\beta\gamma$ podem melhorar ainda mais a eficácia das variantes hAlb-hIL2 mutCD25 sem aumentar as frequências de Treg.

Exemplo 10: Variantes de hAlb-hIL2 contendo mutações mutCD25 e mut $\beta\gamma$ são superiores em comparação com a mutação mut $\beta\gamma$ contendo IL2 e hAlb-hIL2 de tipo selvagem.

[00332] No Exemplo 9, mostramos que a introdução de mutações mut $\beta\gamma$ nas variantes mutCD25 aumentava sua potência para estimular células T específicas de antígeno sem aumentar as frequências de Treg. Em seguida, queríamos testar se as variantes de IL2 contendo mutações mutCD25 e mut $\beta\gamma$ são superiores à variante de IL2 contendo mut $\beta\gamma$ (hAlb-hIL2s). Ratinhos BALB / c (n = 5 por grupo) foram vacinados i.v. com 20 μ g gp70 RNA-LPX nos dias 0 e 7, bem como RNA-LNPs de citocina (dose indicada na figura) nos dias 3 e 10. A análise de linfócitos sanguíneos por meio de citometria de fluxo (ver Exemplo 8) foi realizada nos dias 7 e 14 (Figura 9A). Os números de células T específicas do antígeno foram reforçados para todas as variantes de IL2 em comparação com o controle de hAlb (Figura 9B). É importante ressaltar que, enquanto hAlb-hIL2 e em menor extensão hAlb-hIL2s expandiram Tregs, em grupos tratados com hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s as contagens de Treg não aumentaram (Figura 9C). A falta de expansão de Treg por hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s poderia explicar o forte aumento de células T específicas do antígeno após o segundo tratamento ultrapassando o efeito de hAlb-

hIL2 e a variante de hAlb-hIL2s (Figura 9B). Em comparação, para hAlb-hIL2 e hAlb-hIL2s, a expansão das células T específicas do antígeno diminui após o segundo tratamento, provavelmente devido à supressão das células T efetoras por Tregs induzidas (Figura 9B, C). Da mesma forma, os números de células T CD8 + foram mais fortemente aumentados pelo mutCD25 e mutação mut $\beta\gamma$ contendo hAlb-hIL2_A4s e variantes de hAlb-hIL2_A6s (Figura 9D). Como consequência, a proporção de células T específicas do antígeno para Treg (Figura 9E) e a proporção de células T CD8 + para Treg (Figura 9F) foram ambas massivamente aumentadas pela administração das variantes hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s em comparação com hAlb-hIL2 e hAlb-hIL2s. Todas as variantes de hAlb-hIL2 e especialmente hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s preferencialmente expandiram células T específicas do antígeno (Tetrâmero + / CD8 +) em comparação com células T CD8 + não específicas (Tetrâmero- / CD8 +) (Figura 9G). Curiosamente, hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s induziram frequências mais baixas de células T efetoras de vida curta KLRG1 + CD127- (SLEC) do que hAlb-hIL2 e hAlb-hIL2s (Figura 9H). Uma alta frequência de SLEC afeta negativamente a longevidade de uma resposta de células T devido à probabilidade reduzida de formação de memória (Joshi, N. S. et al. *Immunity* 27, 281-295 (2007)). Além disso, as variantes de hAlb-hIL2_A4s e hAlb-hIL2_A6s expandiram as células NK muito mais fortes do que hAlb-hIL2 e ligeiramente mais fortes do que hAlb-hIL2s (Figura 9I). Todas as mutações contendo mut $\beta\gamma$ resultaram em frações significativamente maiores de células NK que expressam KLRG1 em comparação com hAlb-hIL2

indicando um fenótipo efetor ativado (Figura 9J). As células NK positivas para KLRG1 mostraram proteger contra a doença pulmonar metastática (Renner, P. et al. *Oncoimmunology* 3, e28328 (2014)). Devido à natureza de curta duração das células NK ativadas, as contagens de células NK caem após o primeiro tratamento em todas as mutações contendo mut $\beta\gamma$, mas ainda permanecem mais altas do que no grupo de controle hAlb (Figura 9I).

[00333] Em resumo, a combinação de mutações mutCD25 e itiuíbg aumenta significativamente a eficácia de hAlb-hIL2 para aumentar as células T específicas do antígeno e células NK sem expansão de Tregs levando a um forte aumento na proporção de células T CD8 + (específicas do antígeno) para Tregs.

Exemplo 11: Administração de hAlb-hIL2_A4s aumenta as respostas de células T CD4+

[00334] Nos experimentos anteriores, demonstramos que a administração de variantes de IL2 que contêm mutações mutCD25 e mut $\beta\gamma$ aumentam a indução de células T CD8 + específicas do antígeno. Para testar ainda mais se as células T CD4 + se beneficiariam dessas variantes de IL2, camundongos C57BL / 6 (n = 7 por grupo) foram tratados i.v. com 20 μ g de B16_M30 (Kreiter, S. et al. *Nature* 520, 692-696 (2015)) RNA-LPX e 3 μ g de hAlb, hAlb-hIL2 ou hAlb-hIL2_A4s RNA-LNPs nos dias 0, 7 e 14. Análise de B16_M30 é um neoepítipo restrito ao MHC de classe II da linha de células tumorais B16F10 reconhecida por células T CD4 + (Kreiter, S. et al. *Nature* 520, 692-696 (2015)). Conforme mostrado na Figura 10B e 10C, apenas a co-administração de hAlb-hIL2_A4s, mas não hAlb-

hIL2, aumentou o número de células T efetoras CD4 + / não Tregs (CD25- FoxP3- CD4 +) e células T específicas de tetrâmero B16_M30 + CD4 +, respectivamente.

Exemplo 12: Variantes de IL2 com mutCD25 combinadas e mutações mut $\beta\gamma$ potencializam a eficácia antitumoral da vacinação contra o câncer

[00335] As células T específicas do antígeno tumoral induzidas por vacinação podem controlar o crescimento do tumor, enquanto as Tregs inibem o efeito das células T efetoras (Kreiter, S. et al. Nature 520, 692-696 (2015).). Mostramos anteriormente que hAlb-hlL2 é capaz de melhorar significativamente a eficácia antitumoral da vacinação de RNA gp70 em camundongos portadores de tumor CT26. Portanto, é esperado que variantes melhoradas de hAlb-hlL2 que não aumentam Tregs, como hAlb-hlL2_A4s e hAlb-hlL2_A6s, sejam terapeuticamente ainda mais eficazes.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo **caracterizado pelo** fato de que compreende uma muteína de Interleucina-2 humana (IL2) ou de uma variante funcional de IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma posição tendo um resíduo de aminoácido ácido ou básico na IL2 humana de tipo selvagem que contata a subunidade alfa do complexo de receptor $\alpha\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$), em que se o resíduo de aminoácido for um resíduo de aminoácido ácido na IL2 humana de tipo selvagem, a substituição é por um resíduo de aminoácido básico e se o resíduo de aminoácido for um resíduo de aminoácido básico na IL2 humana de tipo selvagem a substituição é por um resíduo de aminoácido ácido.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a IL2 humana de tipo selvagem tem a sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 17.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato de que o resíduo de aminoácido ácido na IL2 humana de tipo selvagem contata um resíduo de aminoácido básico na subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$.

4. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que o resíduo de aminoácido básico na IL2 humana de tipo selvagem contata um resíduo de aminoácido ácido na subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$.

5. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$.

6. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo** fato de que a substituição reduz a afinidade para IL2R $\alpha\beta\gamma$ em maior extensão do que para o complexo de receptor de $\beta\gamma$ IL2(IL2R $\beta\gamma$).

7. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo** fato de que o polipeptídeo ativa, preferencialmente, as células T efetoras sobre as células T reguladoras.

8. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo** fato de que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma das posições 35 (lisina), 43 (lisina), 61 (ácido glutâmico) e 62 (ácido glutâmico) em relação à IL2 humana de tipo selvagem e numerada de acordo com a IL2 humana de tipo selvagem.

9. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que a posição 35 é substituída.

10. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, **caracterizado pelo** fato de que a posição 35 é substituída por ácido glutâmico.

11. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado pelo** fato de que a posição 43 é substituída.

12. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, **caracterizado pelo** fato de que a posição 43 é substituída por ácido glutâmico.

13. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizado pelo** fato de que a posição 61 é substituída.

14. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 8 a 13, **caracterizado pelo** fato de que a posição 61 é substituída por lisina.

15. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 14, **caracterizado pelo** fato de que a posição 62 é substituída.

16. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 15, **caracterizado pelo** fato de que a posição 62 é substituída por lisina.

17. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 16, **caracterizado pelo** fato de que as posições 43 e 61 são substituídas.

18. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 17, **caracterizado pelo** fato de que a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída por lisina.

19. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 18, **caracterizado pelo** fato de que as posições 35, 43 e 61 são substituídas.

20. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 19, **caracterizado pelo** fato de que a posição 35 é substituída por ácido glutâmico, a posição 43 é substituída por ácido glutâmico e a posição 61 é substituída por lisina.

21 Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 20, **caracterizado pelo** fato de que as posições 61 e 62 são substituídas.

22. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 21, **caracterizado pelo** fato de que a posição 61 é substituída por lisina e a posição 62 é

substituída por lisina.

23. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado pelo** fato de que a IL2 humana ou sua variante funcional compreende ainda uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$.

24. Polipeptídeo **caracterizado pelo** fato de que compreende uma muteína da Interleucina-2 humana (IL2) ou de uma variante funcional da IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional compreende pelo menos (i) uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ e (ii) uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$.

25. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado pelo** fato de que uma ou mais substituições de aminoácidos que reduzem a afinidade para a subunidade alfa de IL2R $\alpha\beta\gamma$ compreendem substituições em uma ou mais posições de IL2 ou uma variante funcional desta selecionada a partir do grupo que consiste em K35, T37, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, K64, P65, E68, L72 e Y107.

26. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, **caracterizado pelo** fato de que uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$ compreendem substituições em uma ou mais posições de IL2 selecionadas do grupo que consiste em K9, L12, Q13, E15, H 16, D20, Q74, L80, R81, D84, L85, 186, N88, 192, L94 e E95.

27. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, **caracterizado pelo** fato de que uma

ou mais substituições de aminoácidos que aumentam a afinidade para IL2R $\beta\gamma$ compreendem o seguinte conjunto de substituições: 80F, 81 D, 85V, 86V, 92F.

28. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado pelo** fato de que é uma IL2 farmacocinética estendida (PK) que compreende ainda uma sequência de aminoácidos que é heteróloga à IL2 ou variante funcional desta fundida à IL2 substituída ou variante funcional desta.

29. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado pelo** fato de que a sequência de aminoácidos que é heteróloga à IL2 ou variante funcional desta é selecionada a partir do grupo que consiste em albumina sérica, um fragmento de imunoglobulina, transferrina e Fn3, ou variantes dos mesmos.

30. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado pelo** fato de que a albumina sérica compreende albumina sérica de camundongo ou albumina sérica humana.

31 Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado pelo** fato de que o fragmento de imunoglobulina compreende um domínio Fc de imunoglobulina.

32. Polinucleotídeo **caracterizado pelo** fato de que codifica o polipeptídeo conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 31.

33. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado pelo** fato de que é RNA.

34. Célula hospedeira, **caracterizada pelo** fato de que compreende o polinucleotídeo conforme definido pela reivindicação 32 ou 33.

35. Composição farmacêutica **caracterizada pelo** fato de que compreende o polipeptídeo, conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 31, o polinucleotídeo, conforme definido pela reivindicação 32 ou 33, ou a célula hospedeira, conforme definido pela reivindicação 34.

36. Método de tratamento de um sujeito, **caracterizado pelo** fato de que compreende administrar ao sujeito o polipeptídeo conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 31, o polinucleotídeo, conforme definido pela reivindicação 32 ou 33, a célula hospedeira conforme definido pela reivindicação 34 ou a composição farmacêutica conforme definido pela reivindicação 35.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado pelo** fato de que o sujeito tem câncer.

38. Método para induzir uma resposta imune em um sujeito, **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração ao sujeito:

a. o polipeptídeo conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 31, o polinucleotídeo conforme definido pela reivindicação 32 ou 33, a célula hospedeira conforme definido pela reivindicação 34 ou a composição farmacêutica conforme definido pela reivindicação 35; e

b. um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno no sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou polipeptídeo.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado pelo** fato de que o polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou polipeptídeo é RNA.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 39, **caracterizado pelo** fato de que o tratamento ativa as células T efectoras sobre as células T regulatórias.

41 Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 40, **caracterizado pelo** fato de que é um método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, em que o antígeno é um antígeno associado a tumor.

42. Método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração ao sujeito:

a. o polipeptídeo conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 31, o polinucleotídeo conforme definido pela reivindicação 32 ou 33, a célula hospedeira conforme definido pela reivindicação 34 ou a composição farmacêutica conforme definido pela reivindicação 35; e

b. um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno associado a tumor no sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou polipeptídeo.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 e 40 a 42, **caracterizado pelo** fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de cólon, mesotelioma, renal carcinoma celular e câncer cerebral.

44. Preparação médica **caracterizada pelo** fato de que compreende:

a. o polipeptídeo, conforme definido por qualquer uma

das reivindicações 1 a 31, o polinucleotídeo, conforme definido pela reivindicação 32 ou 33, a célula hospedeira, conforme definido pela reivindicação 34, ou a composição farmacêutica, conforme definido pela reivindicação 35.

45. Preparação médica, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizada pelo** fato de que compreende ainda:

b. um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo um epítopo para induzir uma resposta imune contra um antígeno em um sujeito ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou polipeptídeo.

46. Preparação médica, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizada pelo** fato de que compreende cada componente a e b em um recipiente separado.

47. Preparação médica, de acordo com a reivindicação 44 ou 45, **caracterizada pelo** fato de que é uma composição farmacêutica.

48. Preparação médica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 46, **caracterizada pelo** fato de que compreende ainda instruções para o uso da preparação médica para o tratamento ou prevenção do câncer, em que o antígeno é um antígeno associado ao tumor.

49. Preparação médica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 48, **caracterizada pelo** fato de que é para uso farmacêutico.

50. Preparação médica, de acordo com a reivindicação 49, **caracterizada pelo** fato de que o uso farmacêutico compreende um tratamento terapêutico ou profilático de uma doença ou distúrbio.

51 Preparação médica, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 44 a 48, **caracterizada pelo** fato de que é para uso em um método para tratar ou prevenir câncer em um sujeito, em que o antígeno é um antígeno associado a tumor.

52. Preparação médica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 51, **caracterizada pelo** fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de cólon, mesotelioma, carcinoma de células renais e câncer cerebral.

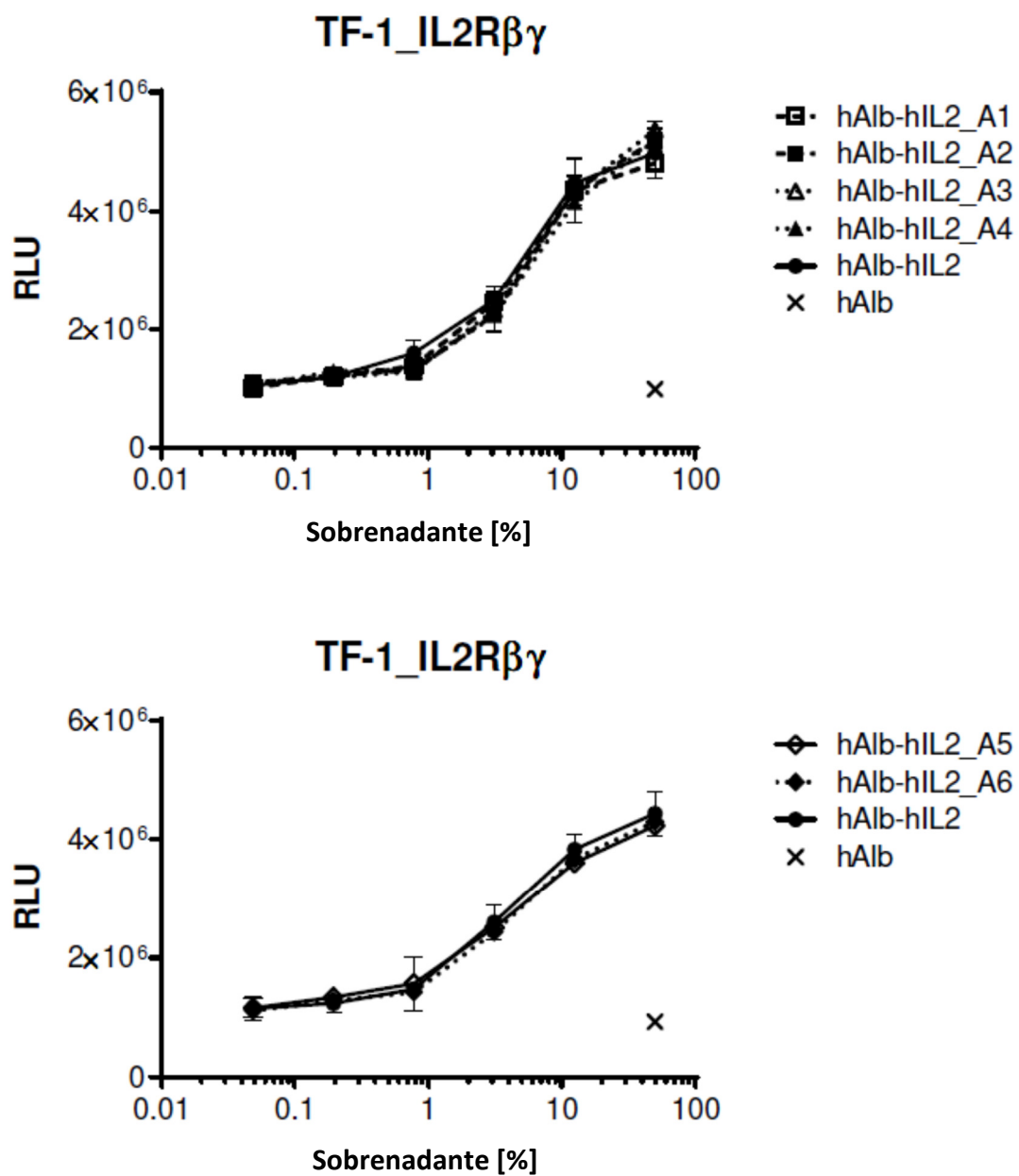
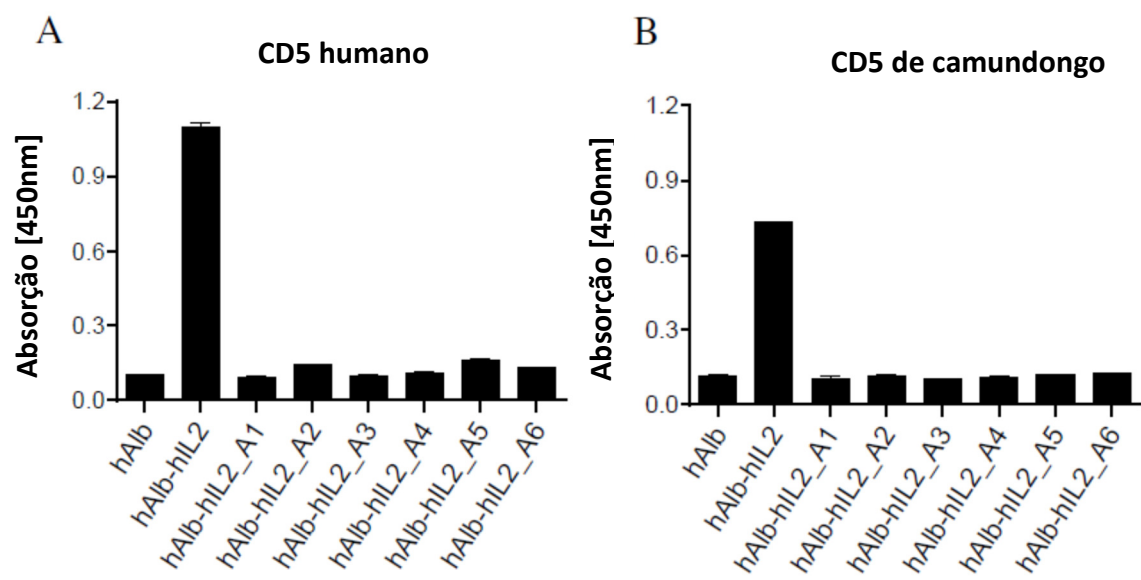


Figura 1

**Figura 2**

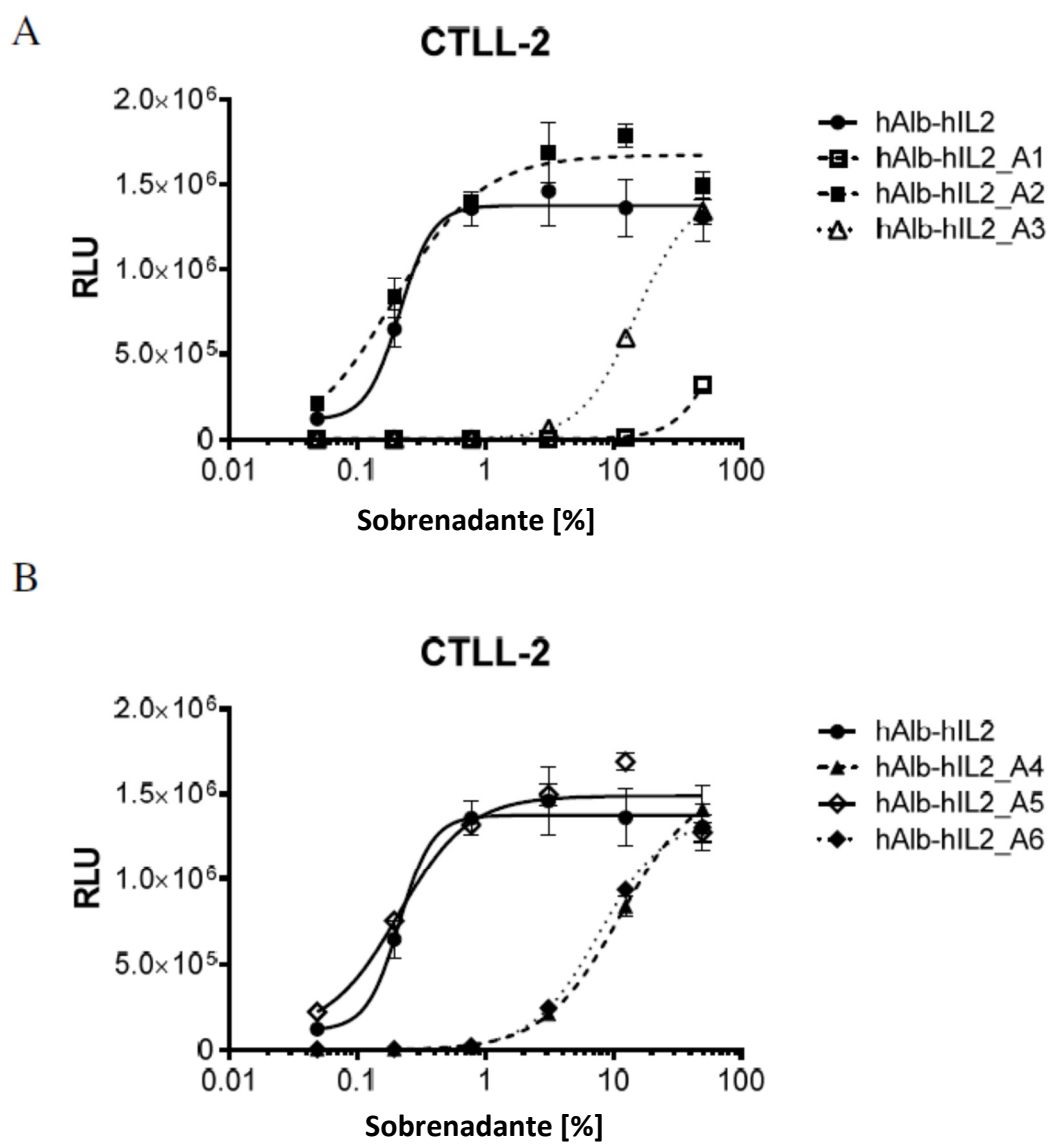


Figura 3

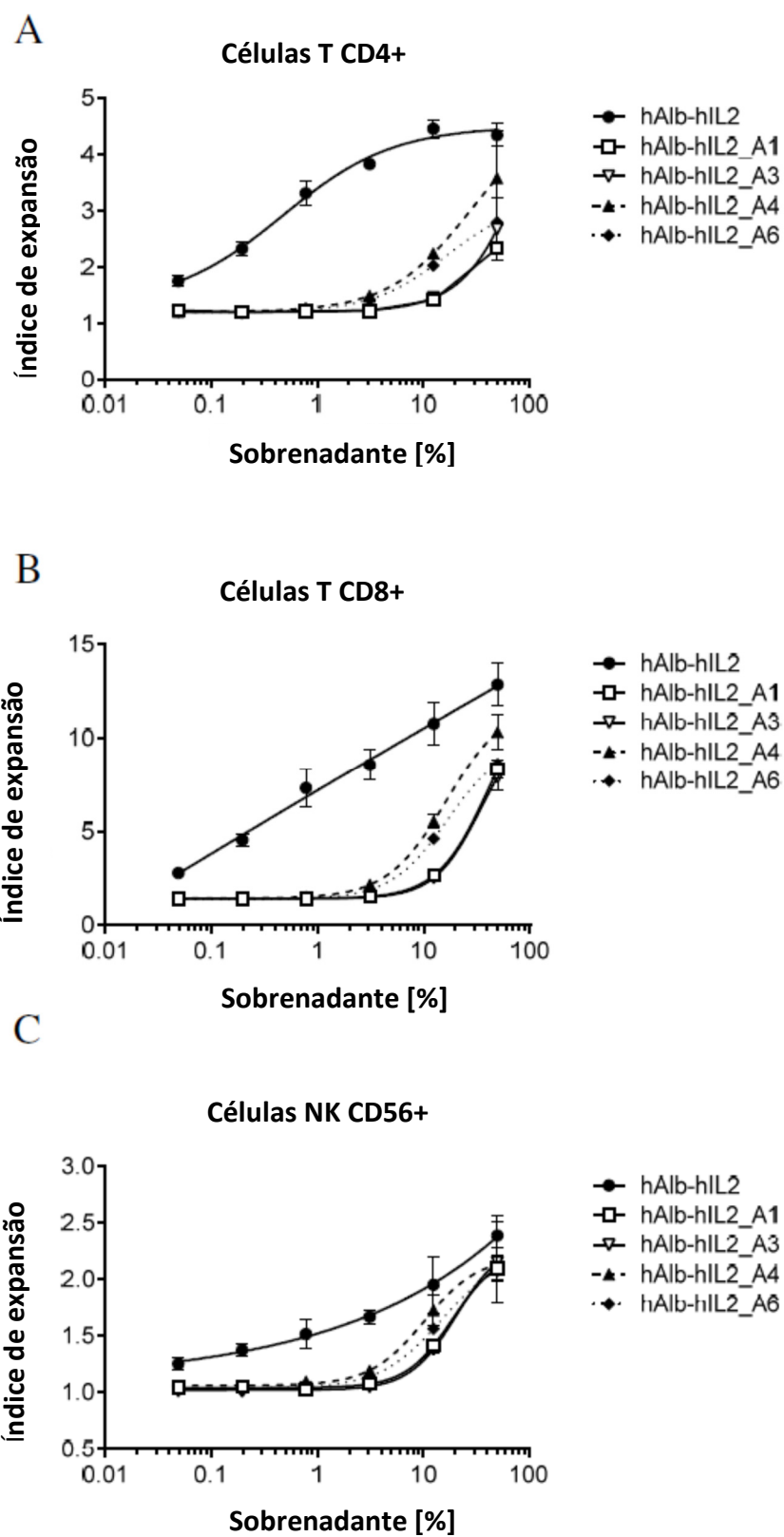
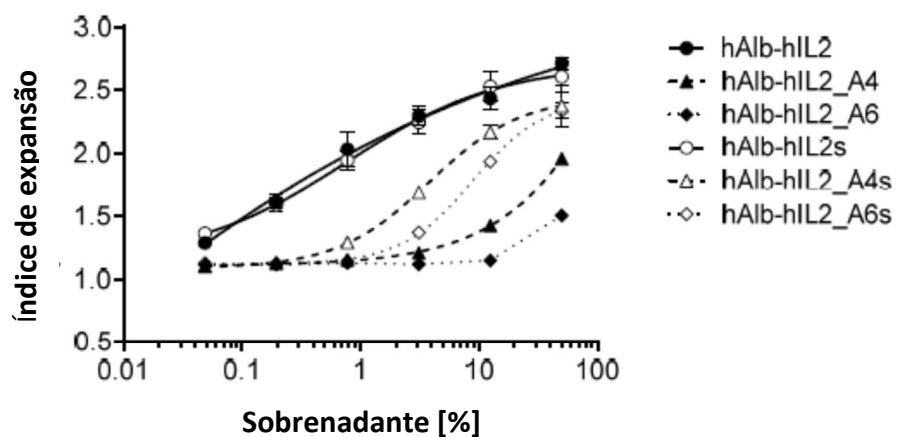


Figura 4

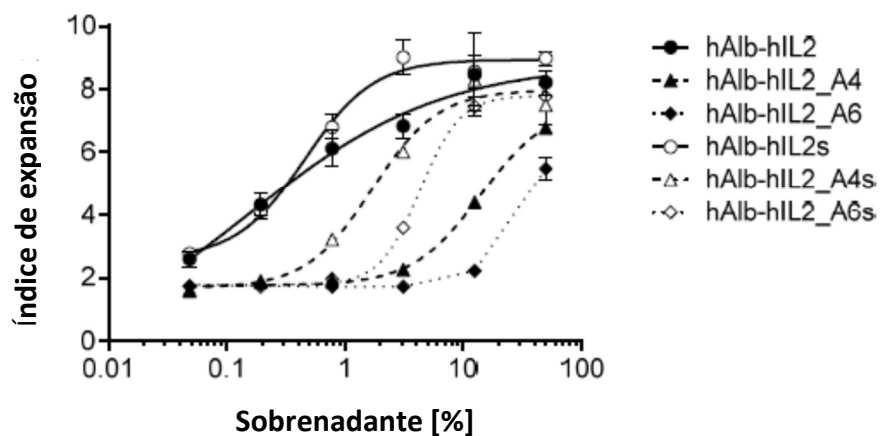
D

Células T CD4+



E

Células T CD8+



F

Células NK CD56+

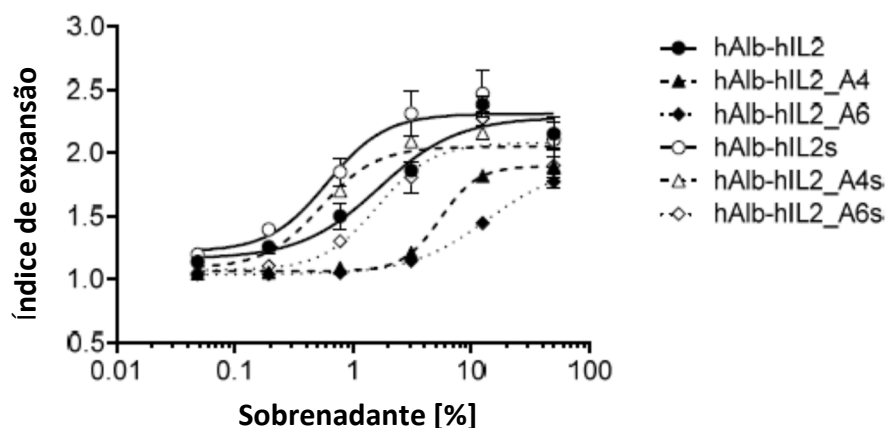


Figura 4 (Continuação)

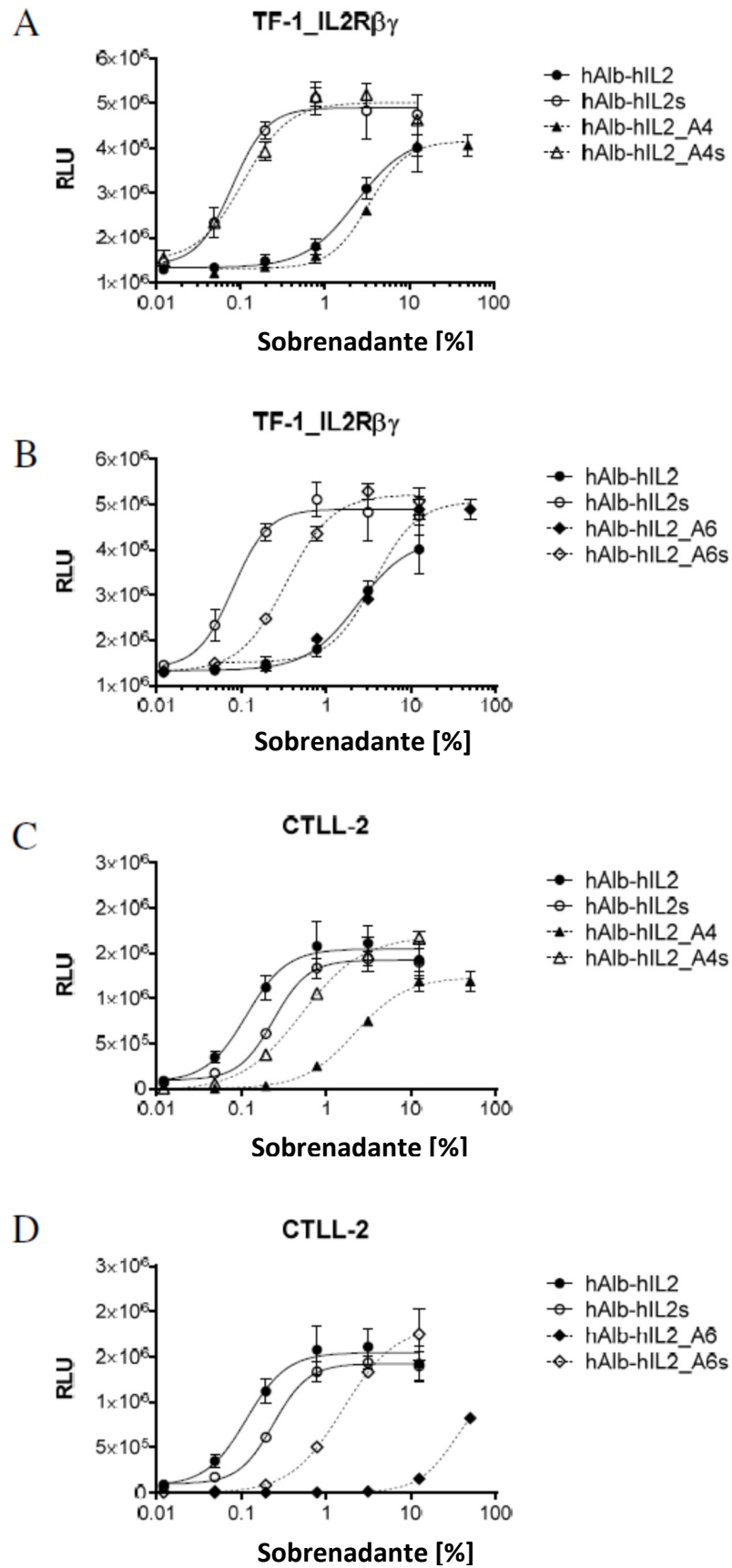
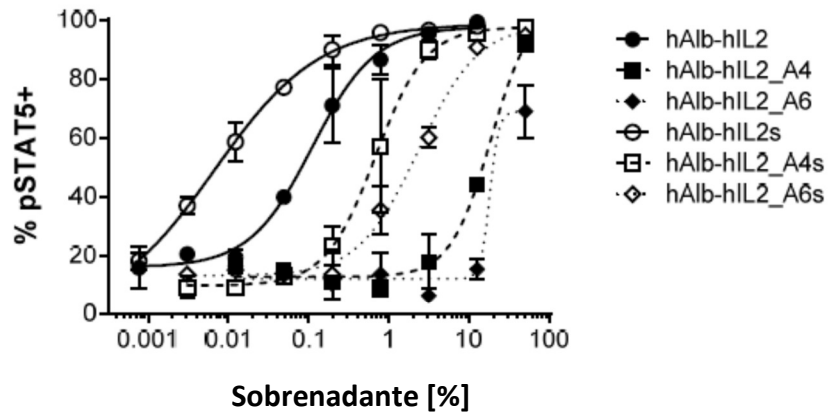
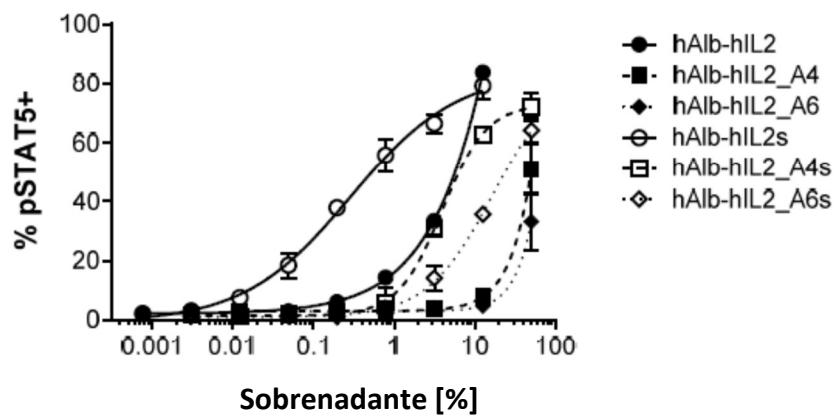


Figura 5

A

Células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺

B

Células CD4⁺ CD25⁻

C

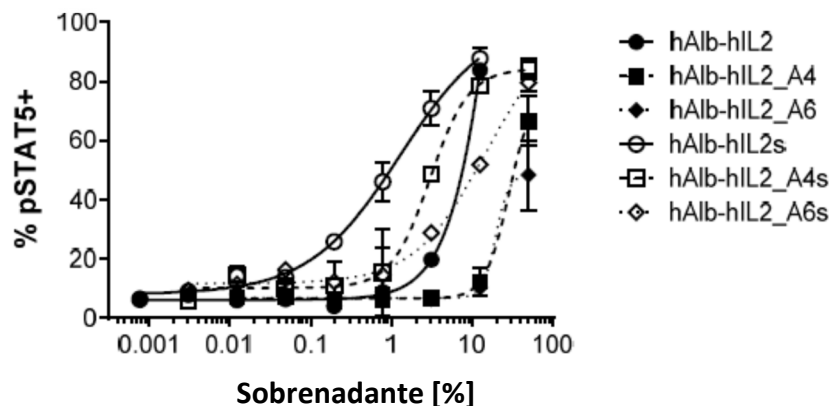
Células T CD8⁺

Figura 6

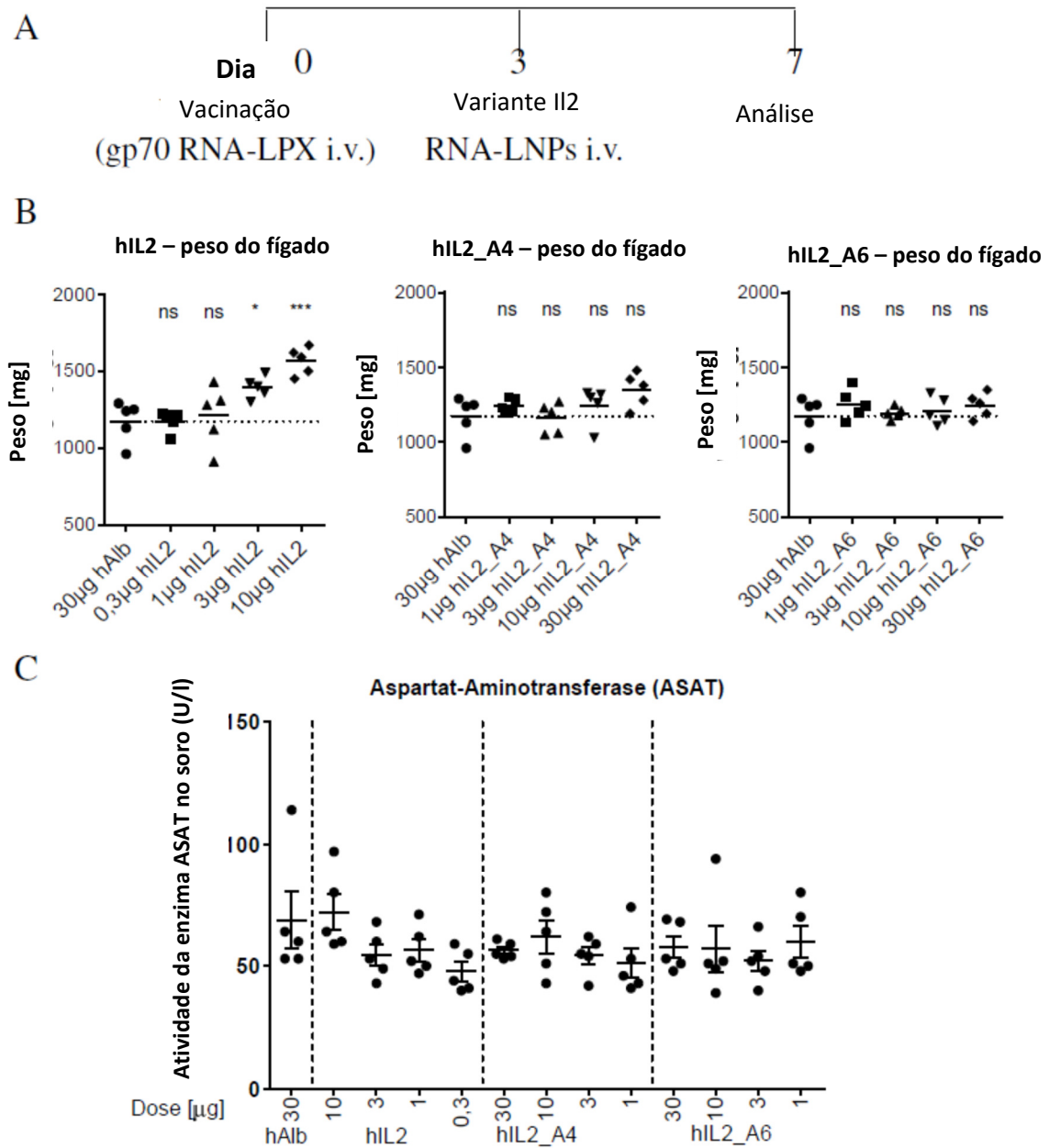


Figura 7

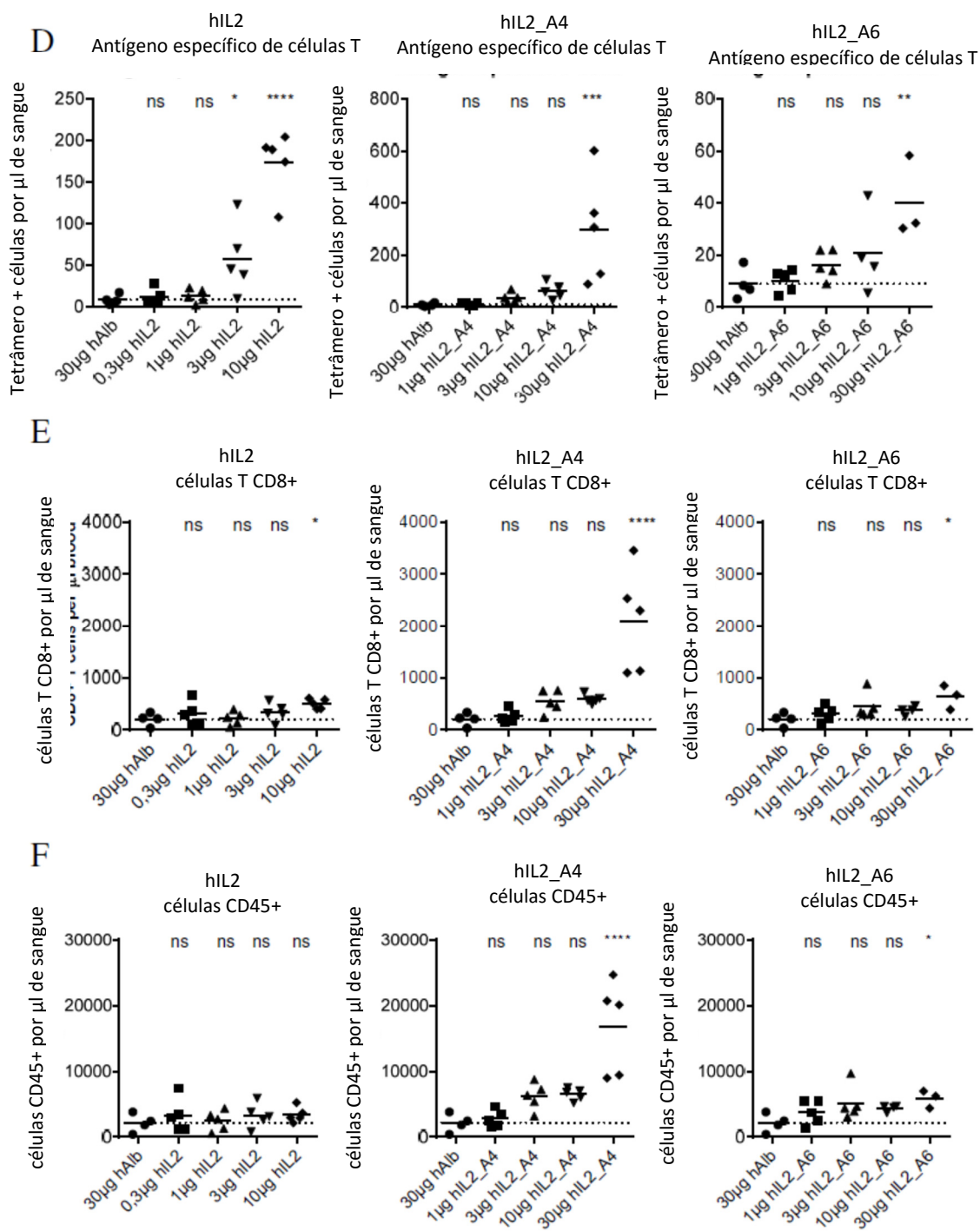


Figura 7 (Continuação)

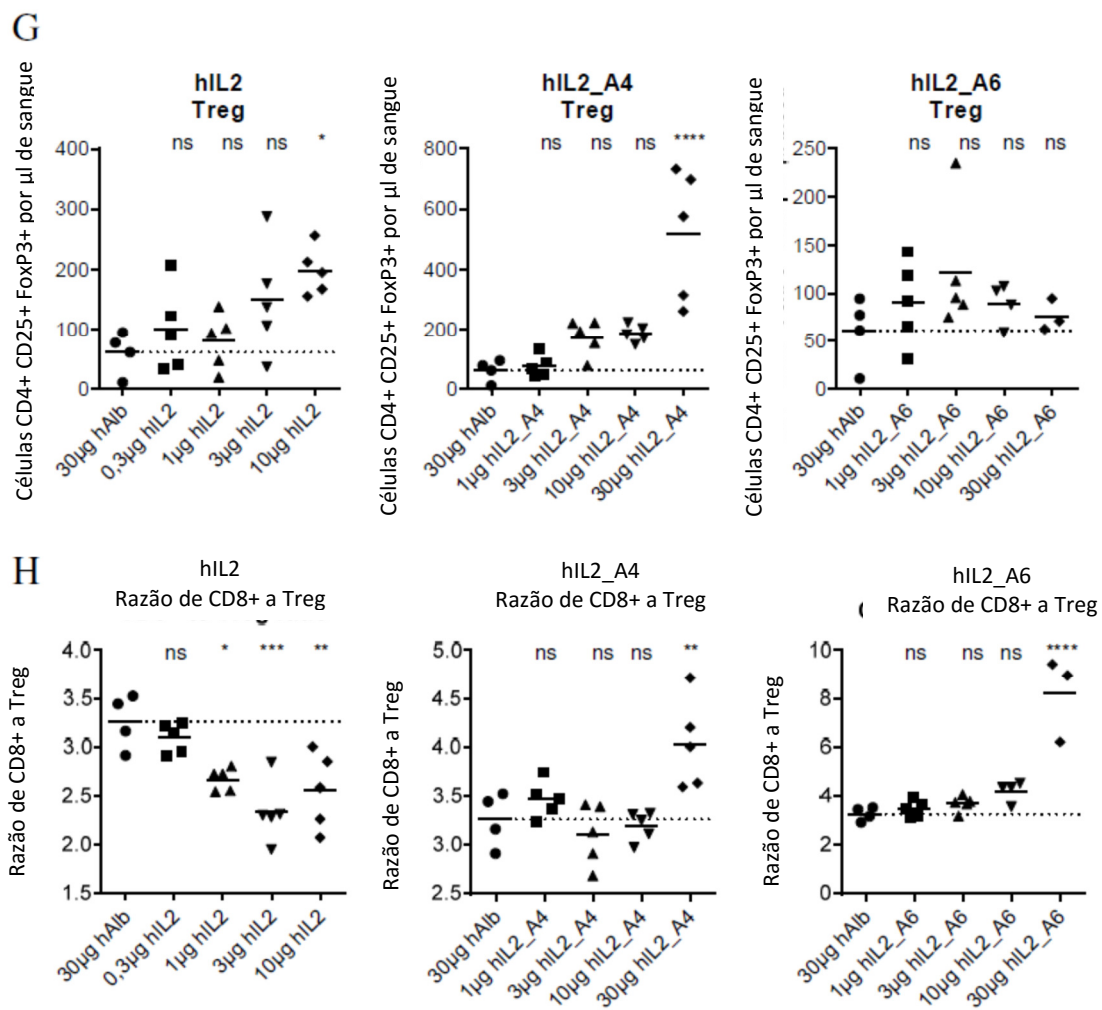


Figura 7 (Continuação)

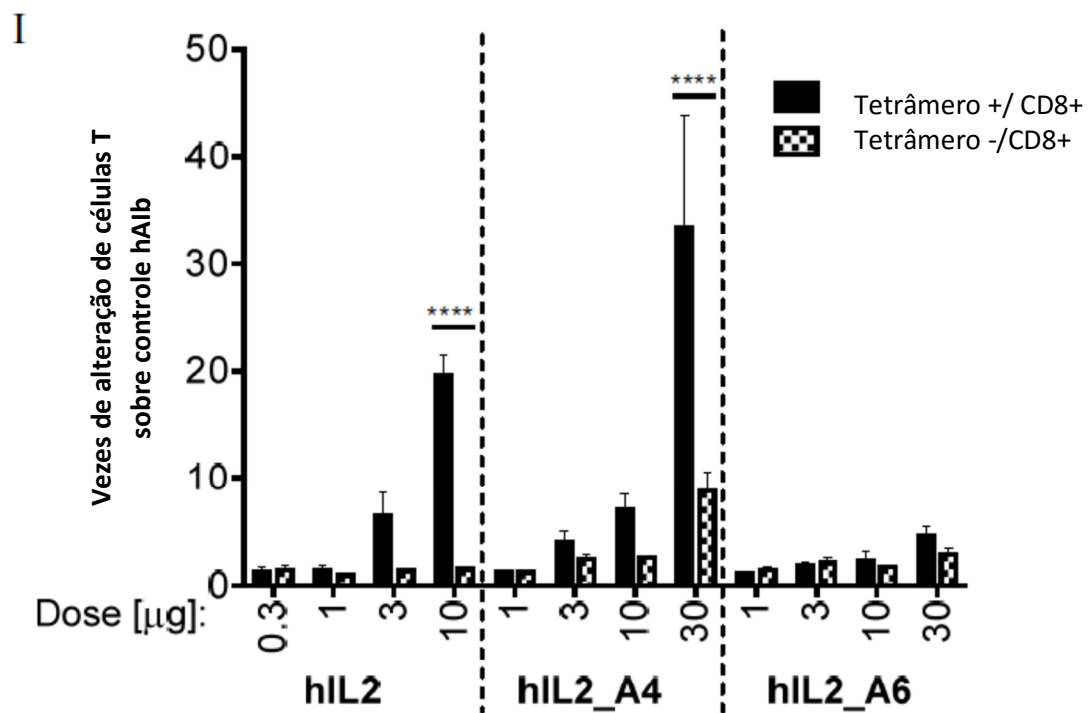
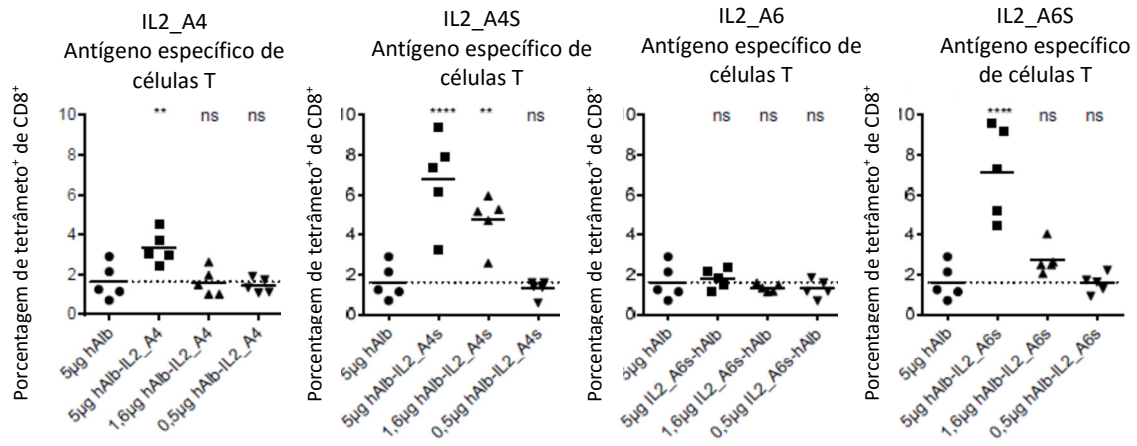
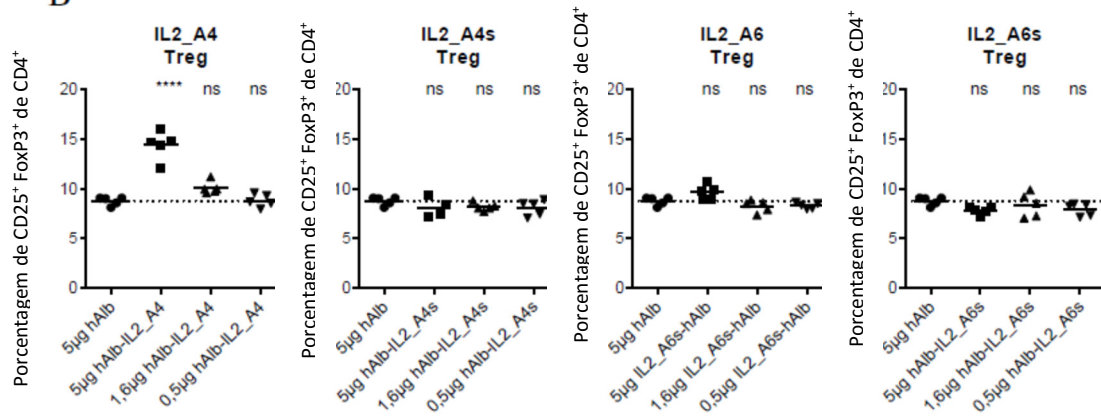
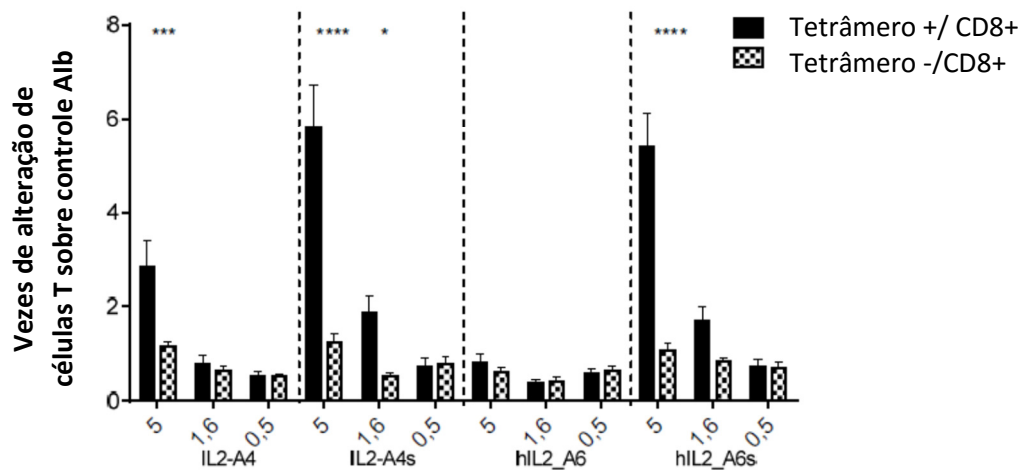


Figura 7 (Continuação)

A**B****C****Figura 8**

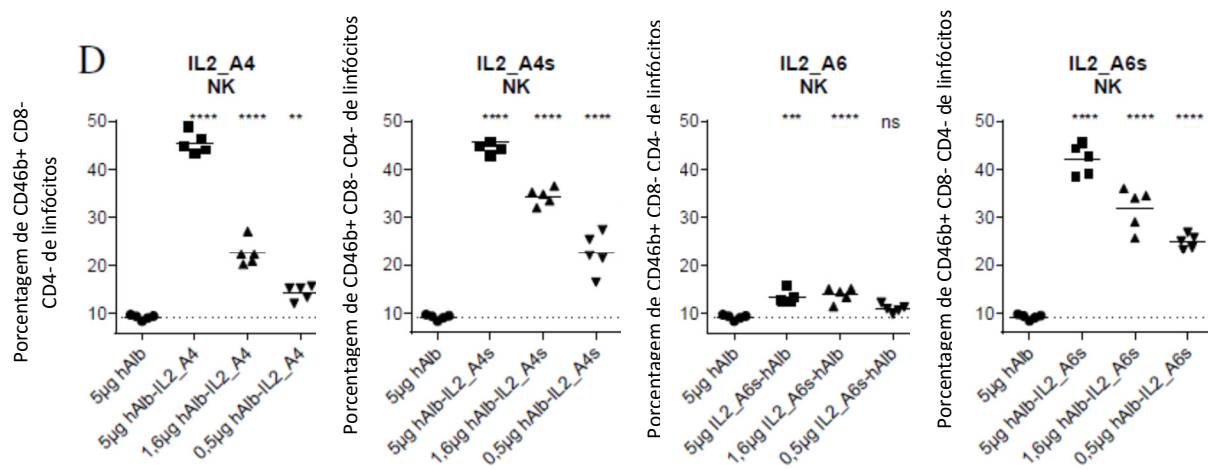


Figura 8 (continuação)

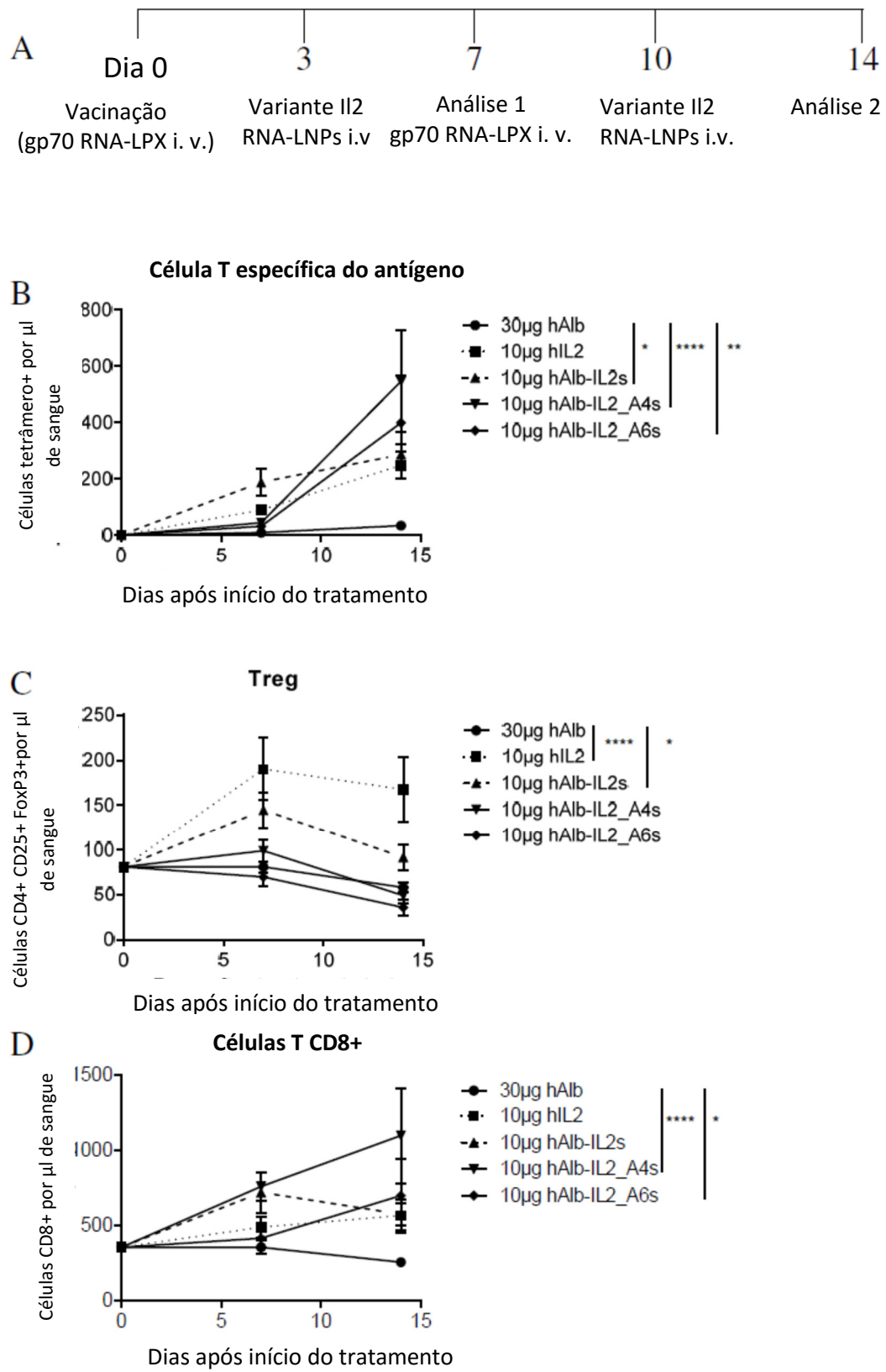


Figura 9

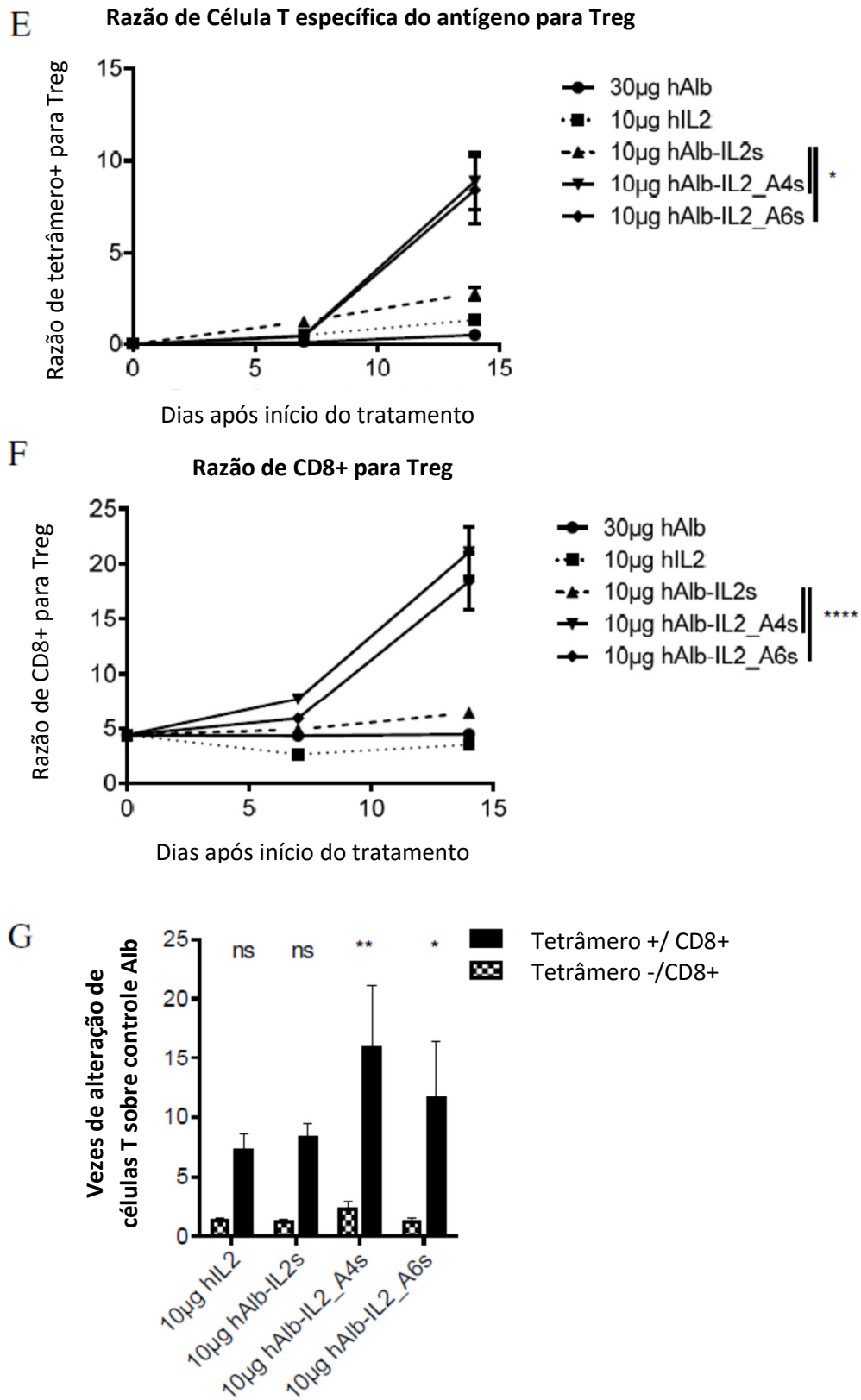


Figura 9 (continuação)

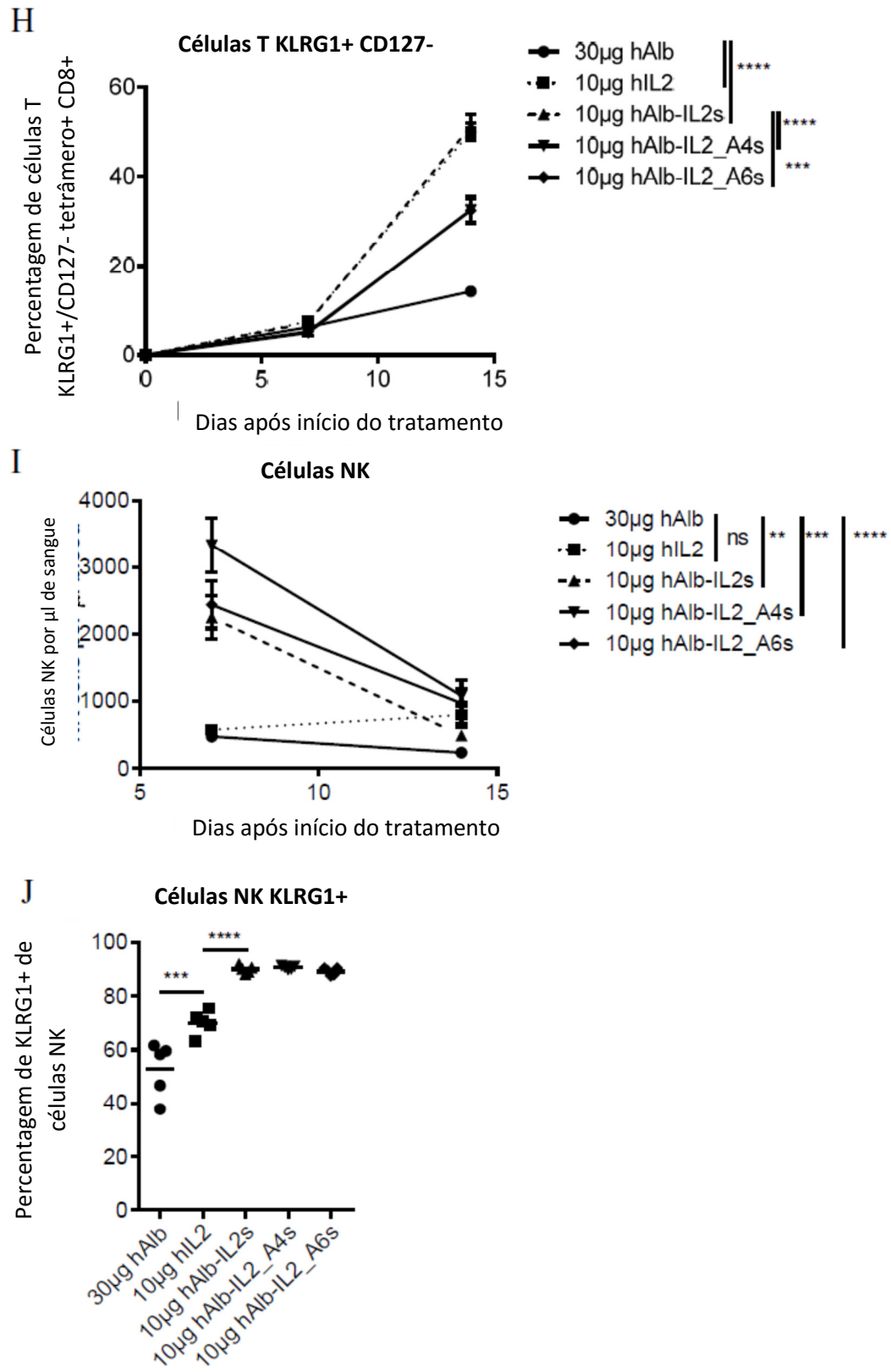


Figura 9 (continuação)

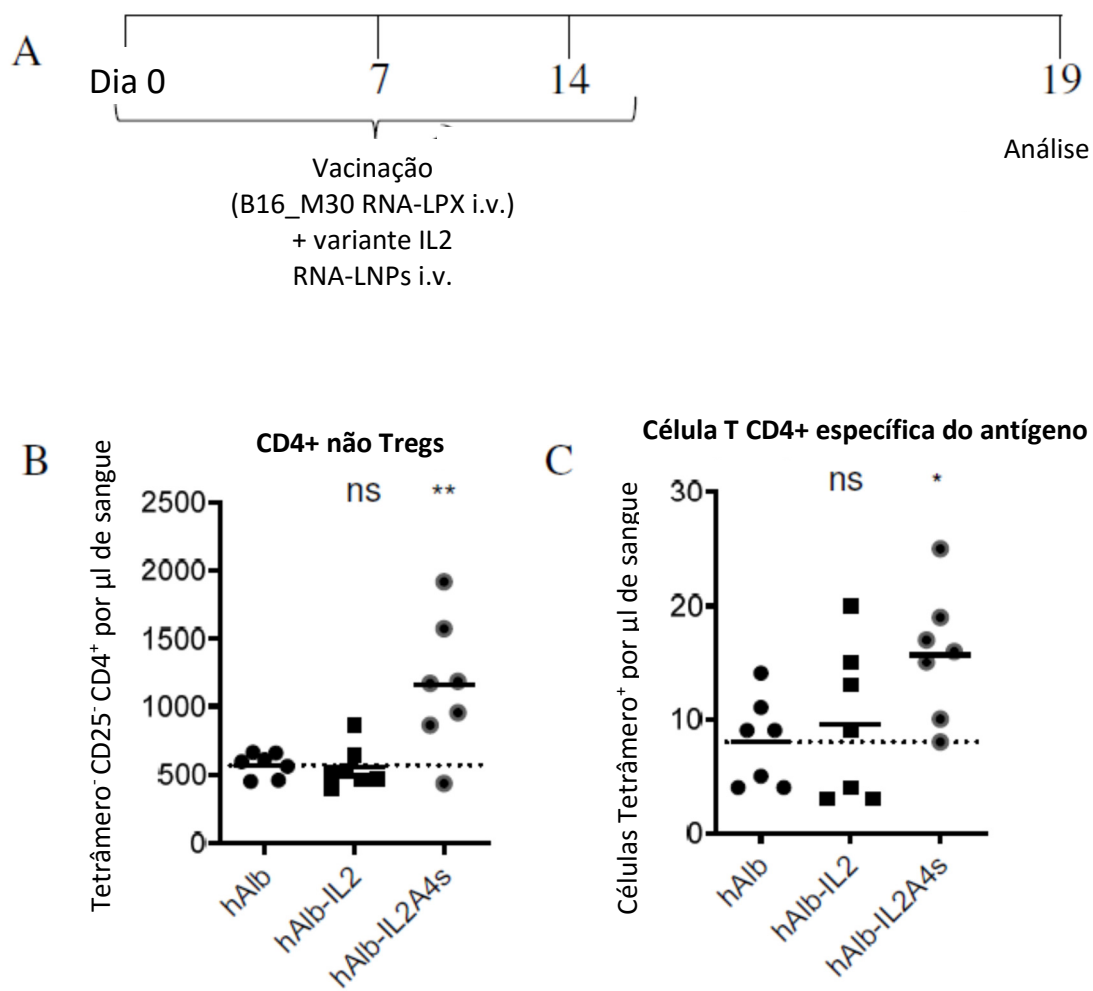


Figura 10

RESUMO**AGONISTAS DE IL2**

A invenção se refere a variantes de interleucina-2 (IL2). Em uma concretização, as variantes de IL2 ativam células T efetoras sobre células T regulatórias. Em particular, a invenção se refere a um polipeptídeo compreendendo uma muteína de IL2 humana ou de uma variante funcional de IL2 humana, em que a IL2 humana ou sua variante funcional é substituída em pelo menos uma posição tendo um resíduo de aminoácido ácido ou básico no tipo selvagem IL2 humana que contata a subunidade alfa do complexo receptor $\alpha\beta\gamma$ IL2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$). A invenção também se refere a polinucleotídeos que codificam para os polipeptídeos da invenção, células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos, composições farmacêuticas compreendendo os polipeptídeos, polinucleotídeos ou células hospedeiras, métodos terapêuticos ou profiláticos de tratamento usando os polipeptídeos, polinucleotídeos, células hospedeiras ou composições farmacêuticas e médicas preparações compreendendo os polipeptídeos, polinucleotídeos, células hospedeiras ou composições farmacêuticas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PN008885 - LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS.txt
- Data de Geração do Código: 15/01/2021
- Hora de Geração do Código: 17:11:16
- Código de Controle:
 - Campo 1: 80B75640635BF0D6
 - Campo 2: 9B5B225D8834621A