

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 511**

51 Int. Cl.:

C07K 14/55 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2019** **PCT/US2019/032321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2019** **WO19222295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2019** **E 19729416 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2023** **EP 3794024**

54 Título: **Polipéptidos de interleucina 2 activables y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

14.05.2018 US 201862671225 P

06.11.2018 US 201862756504 P

06.11.2018 US 201862756507 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2023

73 Titular/es:

WEREWOLF THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
200 Talcott Avenue
Watertown, MA 02472, US

72 Inventor/es:

WINSTON, WILLIAM;
HICKLIN, DANIEL;
BHASKAR, VINAY;
EVNIN, LUKE;
BAEUEERLE, PATRICK;
SALMERON GARCIA, JOSE ANDRES;
BRODKIN, HEATHER;
LIN, SHUOYEN JACK;
WESCHE, HOLGER y
SEIDEL-DUGAN, CYNTHIA

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 955 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de interleucina 2 activables y métodos de uso de los mismos

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. 62/671,225, presentada el 14 de mayo de 2018, la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/756,504, presentada el 6 de noviembre, 2018, y la Solicitud Provisional de EE. UU. n.º 62/756,507, presentada el 6 de noviembre de 2018.

10

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia ASCII, creada el 14 de mayo de 2019, se denomina 105365-0021_SL.txt y tiene un tamaño de 408,319 bytes.

15

Antecedentes

El desarrollo de células linfoides inmunocompetentes maduras a partir de precursores menos comprometidos, sus subsiguientes respuestas inmunitarias impulsadas por antígenos y la supresión de estas y respuestas autorreactivas no deseadas son altamente dependientes y reguladas por citocinas (incluida la interleucina-2 [IL-2], IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, e IL-21) que utilizan receptores en la familia de la cadena γ común (γc) (Rochman et al., 2009) y miembros de la familia que incluyen IL-12, 18 y 23. La IL-2 es esencial para el desarrollo tímico de los linfocitos Treg y regula de manera crítica varios aspectos clave de los linfocitos T convencionales activados por antígenos y Treg periféricos maduros. Debido a su potente actividad de factor de crecimiento de linfocitos T *in vitro*, la IL-2 se ha estudiado ampliamente en parte porque esta actividad ofrecía un medio potencial para estimular directamente la inmunidad, por ejemplo, en pacientes con cáncer y SIDA-VIH, o un objetivo para antagonizar las respuestas no deseadas, por ejemplo, rechazo de trasplantes y enfermedades autoinmunes. Aunque los estudios *in vitro* con IL-2 proporcionaron una sólida justificación para estos estudios, la función de IL-2 *in vivo* es claramente mucho más compleja, como se ilustró por primera vez en ratones con deficiencia de IL-2, donde se observó un síndrome autoinmune letal rápido, que no faltaba inmunidad (Sadlack et al., 1993, 1995). Posteriormente se hicieron observaciones similares cuando el gen que codifica IL-2R α (IL2ra) e IL-2R β (IL2rb) se extirparon individualmente (Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995).

20

25

30

35

40

La actividad antitumoral de algunas citocinas es bien conocida y descrita y algunas citocinas ya se han usado terapéuticamente en humanos. Las citocinas como la interleucina-2 (IL-2) han mostrado actividad antitumoral positiva en pacientes con diferentes tipos de tumores, como carcinoma metastásico de riñón, leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, mieloma múltiple y similares. Otras citocinas como el IFN β , el Factor de Necrosis Tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) α , TNF β , IL-1, 4, 6, 12, 15 y los CSF han mostrado cierta actividad antitumoral en algunos tipos de tumores y por tanto son objeto de nuevos estudios WO2011/123682 se refiere a citocinas activadas por proteasas, DE 197001141 C1 se refiere a una construcción génica que expresa una proteína que puede activarse por proteasas, EP1867669 A1 se refiere a una proteína de fusión escindible proteolíticamente que comprende un factor de coagulación de la sangre, y Puskas et al., Immunology (2011);133:206-220 describe proteínas de fusión de IL-2 activables.

45

Sumario

La presente invención proporciona un polipéptido de fusión de la fórmula:

[A]-[L1]-[B]-[L2]-[D]	o	[A]-[L1]-[D]-[L2]-[B]	o	[D]-[L2]-[B]-[L1]-[A]	o
[B]-[L2]-[D]-[L1]-[A]	o	[D]-[L1]-[B]-[L1]-[A]	o	[B]-[L1]-[D]-[L1]-[A]	

50

en donde,

A es un polipéptido de interleucina 2 (IL-2);

55

B es un elemento de extensión de la semivida, en donde el elemento de extensión de la semivida es albúmina de suero humano, o un polipéptido de unión a antígeno que se une a la albúmina de suero humano;

L1 es un enlazador polipeptídico escindible por proteasa y L2 es un enlazador polipeptídico que es opcionalmente escindible por proteasa, en donde para cada uno de L1 y L2, independientemente, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en una calicreína, trombina, quimasa, carboxipeptidasa A, catepsina G, una elastasa, PR-3, granzima M, una calpaína, una metaloproteínasa de matriz (MMP), un activador de plasminógeno, una catepsina, una caspasa, una triptasa, o una proteasa de la superficie de células tumorales; y;

60

D es un resto bloqueante de IL-2 en donde el resto bloqueante es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une al polipéptido de IL-2; y

5 en donde el polipéptido de fusión tiene una actividad activadora del receptor de IL-2 atenuada, en donde la actividad activadora del receptor de IL-2 del polipéptido de fusión es al menos aproximadamente 10 veces menor que la actividad activadora del receptor de IL-2 del polipéptido que contiene el polipéptido de IL-2 que se produce por la escisión del enlazador escindible por proteasa L1 o, cuando L2 es escindible por proteasa, mediante la escisión tanto de L1 como de L2, y en donde

10 la actividad activadora del receptor de IL-2 se valora usando un ensayo de proliferación de CTLL-2, un ELISA de fosfo STAT, o un ensayo de células informadoras HEK Blue con cantidades iguales en una base molar del polipéptido de IL-2 y el polipéptido de fusión.

15 La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de fusión, un vector que comprende dicho ácido nucleico, y una célula huésped que comprende dicho vector.

La presente invención proporciona además un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende cultivar dicha célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión y recogida de los polipéptidos deseados.

20 La presente invención proporciona además aún una composición farmacéutica, que comprende i) una cantidad efectiva de dicho polipéptido de fusión, y ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 La presente invención también proporciona dicho polipéptido de fusión o composición farmacéutica para su uso como un medicamento.

Estas y otras realizaciones se muestran en las reivindicaciones adjuntas.

30 Descripción detallada

La información técnica mostrada más adelante puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para poner la presente invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Las referencias casuales a los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por métodos de cirugía o terapia y diagnósticos practicados en el cuerpo humano o animal no deben considerarse como que reivindican protección para dichos métodos en sí mismos, sino que, en lugar, deben considerarse como que hacen referencia a productos, en particular, sustancias o composiciones, para su uso en cualquiera de esos métodos.

40 En la presente se proporcionan proteínas de fusión terapéuticas, ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión y, composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión.

45 La invención presenta proteínas de fusión que son variantes condicionalmente activas de IL-2. Los polipéptidos de longitud completa de la invención tienen una actividad de activación del receptor de IL-2 reducida o mínima, aunque contienen un polipéptido de citocina funcional. Tras la activación mediante la escisión de un enlazador que se une a un resto de bloqueo en secuencia a la citocina activa, IL-2 puede unirse a su receptor y efectuar la señalización. El resto de bloqueo es un resto de bloqueo de IL-2 que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une al polipéptido IL-2. Los polipéptidos de fusión de longitud completa contienen un elemento que extiende la semivida sérica que es distinto del resto de polipéptido de bloqueo. El elemento que extiende la semivida es albúmina de suero humano o un polipéptido de unión a antígeno que se une a la albúmina de suero humano. Preferiblemente, este elemento se elimina enzimáticamente en la ubicación corporal deseada (por ejemplo, escisión de proteasa en el microambiente tumoral), restaurando las propiedades farmacocinéticas a la molécula de carga útil (IL2) sustancialmente similar a la molécula de carga útil de origen natural. Preferiblemente, las proteínas de fusión se dirigen a una célula o tejido deseado. Como se describe en la presente, el direccionamiento se logra mediante la acción de un resto de polipéptido de bloqueo que también se une a un objetivo deseado, o mediante un dominio de direccionamiento. El dominio que reconoce un antígeno diana en un objetivo preferido (por ejemplo, un antígeno específico de tumor), puede unirse a la citocina mediante un enlazador escindible o no escindible. Si se une mediante un enlazador no escindible, el dominio de direccionamiento puede ayudar adicionalmente a retener la citocina en el tumor y puede considerarse un dominio de retención. El dominio de direccionamiento no necesita estar unido directamente a la molécula de carga útil y puede estar unido directamente a otro elemento de la proteína de fusión. Esto es especialmente cierto si el dominio de direccionamiento se une mediante un enlazador escindible.

65 En un aspecto se proporciona un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de IL-2 y un resto de bloqueo. El resto de bloqueo se fusiona con el polipéptido de IL-2 a través de un enlazador que contiene un

sitio de escisión de proteasa como se define en las reivindicaciones adjuntas, y el polipéptido de citocina se libera del resto de bloqueo y puede unirse a su receptor, después de la escisión mediada por proteasa del enlazador. El enlazador se diseña para ser escindido en el sitio de la actividad de la citocina deseada, por ejemplo, en el microambiente tumoral, evitando la actividad de la citocina fuera de la diana y reduciendo la toxicidad global de la terapia con citocinas.

El polipéptido de fusión de la invención comprende además un elemento aparte de extensión de la semivida sérica. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende además un dominio de direccionamiento. En varias realizaciones, el elemento de extensión de la semivida sérica es albúmina sérica humana (HSA) de longitud completa o un fragmento que conserva la unión a FcRn, o un nanocuerpo que se une a la albúmina sérica humana.

Además de los elementos de extensión de la semivida sérica, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente comprenden preferiblemente al menos uno o más dominios de direccionamiento que se unen a uno o más antígenos diana o una o más regiones en un solo antígeno diana. En la presente se contempla que una construcción polipeptídica de la invención se escinde, por ejemplo, en un microambiente específico de la enfermedad o en la sangre de un sujeto en el sitio de escisión de proteasa y que el dominio o dominios de direccionamiento se unirán a un antígeno dirigido en una célula objetivo. Al menos un antígeno diana está involucrado y/o asociado con una enfermedad, trastorno o afección. Los antígenos diana de ejemplo incluyen aquellos asociados con una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria, un trastorno inmunológico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa, una enfermedad viral, una reacción alérgica, una reacción parasitaria, una enfermedad de injerto contra huésped o una enfermedad de huésped contra injerto.

En algunas realizaciones, un antígeno diana es una molécula de superficie celular, como una proteína, un lípido o un polisacárido. En algunas realizaciones, un antígeno diana está en una célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula infectada por bacterias, un glóbulo rojo dañado, una célula de placa arterial o una célula de tejido fibrótico.

Los antígenos diana, en algunos casos, se expresan en la superficie de una célula o tejido enfermo, por ejemplo, un tumor o una célula cancerosa. Los antígenos diana para tumores incluyen, pero no se limitan a, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAPa, por sus siglas en inglés), glucoproteína de trofoblasto (5T4), transductor de señal de calcio asociado al tumor 2 (Trop2), fibronectina EDB (EDB-FN), dominio EIIIB de fibronectina, CGS-2, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, c-Met, FOLR1 y CEA. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente también incluyen proteínas que comprenden dos dominios de unión a antígenos que se unen a dos antígenos diana diferentes que se sabe que se expresan en una célula o tejido enfermo. Los pares ejemplares de dominios de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, EGFR/CEA, EpCAM/CEA y HER-2/HER-3.

En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos comprenden independientemente un scFv, un dominio VH, un dominio VL, un dominio que no es Ig o un ligando que se une específicamente al antígeno diana. En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos se unen específicamente a una molécula de superficie celular. En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos se unen específicamente a un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos se unen específica e independientemente a un antígeno tumoral seleccionado de al menos uno de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA y FOLR1. En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos se unen específica e independientemente a dos antígenos diferentes, en donde al menos uno de los antígenos es un antígeno tumoral seleccionado de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA y FOLR1. En algunas realizaciones, el polipéptido dirigido sirve como dominio de retención y se une a la citocina mediante un enlazador no escindible.

Como se describe en la presente, el resto de bloqueo de citocina puede unirse a la IL-2 y así bloquear la activación del receptor afín de la IL-2.

Esta descripción también se refiere a ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, ARN, ARNm, que codifican el polipéptido de fusión definido en las reivindicaciones, así como a vectores y células huésped que contienen dichos ácidos nucleicos.

Esta descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva del polipéptido de fusión de la invención y un excipiente vehículo fisiológicamente aceptable.

La descripción también se refiere al polipéptido de fusión o composición farmacéutica para su uso como un medicamento, típicamente en un sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria, un trastorno inmunológico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa, una enfermedad viral, una reacción alérgica, una reacción parasitaria, una enfermedad de injerto contra huésped o enfermedad de huésped contra injerto.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1a** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa que incluye un resto de bloqueo. El resto de bloqueo puede funcionar opcionalmente como un dominio de extensión de la semivida sérica. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada a un resto de bloqueo a través de un enlazador escindible por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que en un entorno inflamatorio o tumoral, una proteasa se escinde en un sitio de escisión de proteasa en el enlazador, liberando el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una a su receptor.

La **FIG. 1b** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa en donde la HSA (resto de bloqueo) se une directamente a la citocina o quimioquina de interés, con un sitio de escisión de proteasa entre la HSA y una citocina o quimioquina de interés. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada a un resto de bloqueo a través de un enlazador escindible por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que, en un entorno inflamatorio o tumoral, la proteasa se escinde en un sitio de escisión de proteasa en el enlazador, liberando el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una a su receptor.

La **FIG. 1c** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa en donde más de una HSA (resto de bloqueo) se une directamente a la molécula de interés. Si se desea, una o más de las HSA se pueden unir a la citocina o quimioquina a través de un enlazador, tal como un enlazador que contiene un sitio de escisión de proteasa. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada a un resto de bloqueo a través de un enlazador escindible por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que, en un entorno inflamatorio o tumoral, la proteasa se escinde en el sitio de escisión de proteasa en el enlazador, liberando el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una al receptor. La citocina ahora tiene propiedades de pK similares en comparación con la citocina nativa (por ejemplo, tiene una semivida corta).

La **FIG. 1d** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa que comprende más de una citocina, del mismo tipo o de tipo diferente, cada una de las cuales está unida a un dominio de unión a través de un enlazador escindible por proteasa. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada a un resto de bloqueo a través de un enlazador escindible por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que, en un entorno inflamatorio o tumoral, una proteasa se escinde en un sitio de escisión de proteasa en el enlazador, liberando el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una a su receptor.

La **FIG. 2** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa que comprende un polipéptido de citocina o quimioquina, un resto de bloqueo y un dominio que extiende la semivida sérica conectado por al menos un enlazador escindible por proteasa. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada a un resto de bloqueo a través de enlazadores escindibles por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. También está unido a un elemento de extensión de la semivida aparte, que extiende la semivida sérica. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que, en un entorno inflamatorio o tumoral, una proteasa se escinde en un sitio de escisión de proteasa en el enlazador, liberando así el elemento de extensión de la semivida sérica y el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una a su receptor. La citocina ahora tiene propiedades de pK similares en comparación con la citocina nativa (por ejemplo, una semivida corta).

La **FIG. 3** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa que comprende un polipéptido de citocina o quimioquina, un resto de bloqueo y un dominio de direccionamiento conectado por al menos un enlazador escindible por proteasa. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada a un resto de bloqueo y un dominio de direccionamiento a través de un enlazador escindible por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que en un microambiente inflamatorio o tumoral una proteasa se escinde en el sitio de escisión de proteasa en el enlazador, liberando el dominio de direccionamiento y el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una a su receptor.

La **FIG. 4a** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa que comprende un polipéptido de citocina o quimioquina, un resto de bloqueo, un dominio de direccionamiento y un dominio de extensión de la semivida sérica conectado por al menos un enlazador escindible por proteasa, en donde el polipéptido de citocina y el dominio de direccionamiento están conectados por un enlazador escindible por proteasa. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que un polipéptido de citocina está conectado con el dominio de direccionamiento, el resto de bloqueo y el elemento de extensión de la semivida a través de enlazador o enlazadores escindibles por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que, en un entorno inflamatorio o tumoral, la proteasa se escinde en un sitio de escisión de proteasa en el enlazador o los enlazadores, liberando el elemento de extensión de la semivida, el dominio de direccionamiento y el resto de bloqueo, y permitiendo que la citocina se una a su receptor. La citocina ahora tiene propiedades de pK similares en comparación con la citocina nativa (por

ejemplo, semivida corta).

La **FIG. 4b** es un esquema que ilustra una citocina o quimiocina activada por proteasa que comprende un polipéptido de citocina o quimiocina, un resto de bloqueo, un dominio de direccionamiento y un dominio de extensión de la semivida sérica conectado por al menos un enlazador escindible por proteasa. A la izquierda de la flecha, el dibujo muestra que una citocina está conectada al dominio de direccionamiento, un resto de bloqueo y un elemento de extensión de la semivida a través de enlazador o enlazadores escindibles por proteasa, bloqueando así su capacidad para unirse a su receptor. A la derecha de la flecha, el dibujo muestra que, en un entorno inflamatorio o tumoral, la proteasa escinde en un sitio de escisión de proteasa en el enlazador o los enlazadores, liberando el elemento de extensión de la semivida y el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una al receptor. El resto de direccionamiento permanece unido, manteniendo la citocina en el microambiente tumoral. La citocina ahora tiene propiedades de pK similares en comparación con la citocina nativa (por ejemplo, una semivida corta).

La **FIG. 5** es un esquema que ilustra la estructura de un dominio variable de una molécula de inmunoglobulina. Los dominios variables de las cadenas de inmunoglobulinas ligeras y pesadas contienen tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). Las tres CDR de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son los bucles que conectan las cadenas beta B-C, C'-C'' y F-G del pliegue de inmunoglobulina, mientras que los bucles inferiores que conectan las cadenas beta AB, CC', C''-D y E-F del pliegue de inmunoglobulina y el bucle superior que conecta las cadenas D-E del pliegue de inmunoglobulina son los bucles sin CDR.

La **FIG. 6** es un esquema que ilustra una citocina o quimioquina activada por proteasa que comprende un polipéptido de citocina o quimioquina, un resto de bloqueo que es un dominio de unión a albúmina sérica (por ejemplo, un dAb) y un enlazador escindible por proteasa. En el ejemplo ilustrado, los bucles sin CDR en un dominio de unión a albúmina sérica (por ejemplo, un sdAb) pueden formar un sitio de unión para la citocina IL-2. En este ejemplo, el sitio de unión para la albúmina sérica puede estar formado por las CDR del dominio de unión a la albúmina sérica.

Las **FIG. 7a-7h** son una serie de gráficos que muestran la actividad de proteínas de fusión de IL-2 ejemplares en la línea de células de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2, CTLL-2. Cada gráfico muestra los resultados del ensayo de proliferación de IL-2 cuantificados mediante el ensayo de viabilidad celular basado en luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega). Cada ensayo de proliferación se realizó con HSA (Fig. 7b, 7d, 7f, 7h) o sin (Fig. 7a, 7c, 7e, 7g). Cada proteína de fusión comprende un aglutinante anti-HSA, y en cada ensayo se usaron versiones de la proteína de fusión no escindidas y escindidas por la proteasa MMP9.

Las **FIG. 8a-8f** son una serie de gráficos que muestran la actividad de las proteínas de fusión de IL-2 ejemplares en la línea de células de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2, CTLL-2. Cada gráfico muestra los resultados del ensayo de proliferación de IL-2 cuantificados mediante el ensayo de viabilidad celular basado en luminiscencia CellTiter-Glo (Promega). En cada ensayo se utilizaron versiones de la proteína de fusión no escindidas y escindidas por la proteasa MMP9.

Las **FIG. 9a-9z** son una serie de gráficos que muestran la actividad de las proteínas de fusión de IL-2 ejemplares en la línea de células de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2, CTLL-2. Cada gráfico muestra los resultados del ensayo de proliferación de IL-2 cuantificados mediante el ensayo de viabilidad celular basado en luminiscencia CellTiter-Glo (Promega). En cada ensayo se utilizaron versiones de la proteína de fusión no escindidas y escindidas por la proteasa MMP9.

La **FIG. 10** muestra los resultados del ensayo de escisión de proteínas, como se describe en el Ejemplo 2. La proteína de fusión ACP16 se procesó en un gel SDS-PAGE tanto en forma escindida como no escindida. Como puede verse en el gel, la escisión fue completa.

Las **FIG. 11a-11c** son una serie de gráficos que representan los resultados de un ensayo indicador de IL-2 HEK-Blue realizado en proteínas de fusión de IL-2 e IL-2 humana recombinante (Rec hIL-2). El análisis se realizó basándose en la cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina secretada (SEAP, por sus siglas en inglés) utilizando el reactivo QUANTI-Blue (InvivoGen).

Las **FIG. 12a-12b** son dos gráficos que muestran el análisis de ACP16 (FIG. 12a) y ACP124 (FIG. 12b) en un ensayo indicador de IL-2 HEKBlue en presencia de HSA. Los círculos representan la actividad del polipéptido sin cortar, los cuadrados representan la actividad del polipéptido cortado. La FIG. 12c es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de proliferación de CTLL-2. Las células CTLL2 (ATCC) se sembraron en placas en suspensión a una concentración de 500.000 células/pocillo en medio de cultivo con o sin 40 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) y se estimularon con una serie de diluciones de hIL2 activable durante 72 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Se ensayó la actividad de ACP16 activable no escindida y escindida. La hIL2 activable escindida se generó mediante incubación con actividad celular MMP9 activa utilizando un ensayo de viabilidad celular basado en luminiscencia CellTiter-Glo (Promega). Los círculos representan la proteína de fusión intacta

y los cuadrados representan la proteína de fusión escindida por proteasa.

Las **FIG. 13a-13c** es tres gráficos que muestran los resultados del análisis de ACP16, ACP124 en un modelo de xenoinjerto de tumor. La **FIG. 13a** muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones tratados con 4,4 µg de ACP16 (cuadrados), 17 µg de ACP16 (triángulos), 70 µg de ACP16 (triángulos hacia abajo), 232 µg de ACP16 (círculos oscuros) y como comparador 12 µg de IL-2 de tipo salvaje (línea discontinua, triángulos) y 36 µg de IL-2 de tipo salvaje (línea discontinua, diamantes). El vehículo solo se indica mediante grandes círculos abiertos. Los datos muestran que el volumen del tumor disminuye con el tiempo de una manera dependiente de la dosis en ratones tratados con ACP16 a concentraciones más altas. La **FIG. 13b** muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones tratados con 17 µg de ACP124 (cuadrados), 70 µg de ACP124 (triángulos), 230 µg de ACP124 (triángulos hacia abajo) y 700 µg de ACP124. El vehículo solo se indica mediante grandes círculos abiertos. La **FIG. 13c** muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones tratados con 17 µg de ACP16 (triángulos), 70 µg de ACP16 (círculos), 232 µg de ACP16 (círculos oscuros) y, como comparador, 17 µg de ACP124 (línea discontinua, triángulos) 70µg de ACP124 (línea discontinua, diamantes), 230 µg de ACP124 (línea discontinua, diamantes). El vehículo solo está indicado por triángulos oscuros hacia abajo. Los datos muestran que el volumen tumoral disminuye con el tiempo de una manera dependiente de la dosis en ratones tratados con ACP16, pero no con ACP124

Las **FIG. 14a-14c** son una serie de diagramas de espaguetis que muestra la actividad de las proteínas de fusión en un modelo de xenoinjerto de ratón MC38 correspondiente a los datos mostrados en la **FIG. 13**. Cada línea en los diagramas es un solo ratón.

La **FIG. 15** es un gráfico que muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo en un modelo de xenoinjerto de ratón que muestra el crecimiento del tumor en ratones de control (círculos abiertos) y ratones tratados con AP16 (cuadrados).

Las **FIG. 16a-16d** es una serie de diagramas de supervivencia que muestra la supervivencia de ratones a lo largo del tiempo después del tratamiento con proteínas de fusión escindibles. La **FIG. 16a** muestra datos para ratones tratados solo con vehículo (línea gris), 17 µg de ACP16 (línea oscura) y 1 µg de ACP124 (línea discontinua). La **FIG. 16b** muestra datos para ratones tratados solo con vehículo (línea gris), 70 µg de ACP16 (línea oscura) y 70 µg de ACP124 (línea discontinua). La **FIG. 16c** muestra datos para ratones tratados solo con vehículo (línea gris), 232 µg de ACP16 (línea oscura) y 230 µg de ACP124 (línea discontinua). La **FIG. 16d** muestra datos para ratones tratados solo con vehículo (línea gris), 232 µg de ACP16 (línea oscura) y 700 µg de ACP124 (línea discontinua).

La **FIG. 17** una serie de diagramas de espagueti que muestran la actividad de las proteínas de fusión en un modelo de xenoinjerto de ratón MC38. Todos los grupos de ratones recibieron cuatro dosis en total, excepto las tres dosis más altas de APC132, en donde se detectó toxicidad mortal después de 1 semana/2 dosis. Se muestran el vehículo solo (arriba), 17, 55, 70 y 230 µg de ACP16 (fila superior completa), 9, 38, 36 y 119 µg de ACP132 (fila central completa) y 13, 42, 54 y 177 µg de ACP21 (fila inferior completa). Cada línea de los diagramas representa un animal individual.

Las **FIG. 18-23** ilustran las propiedades de los polipéptidos TriTac, que sirven como ejemplos de proteínas de fusión escindibles por proteasa.

Descripción detallada adicional

En la presente se describen métodos y composiciones para preparar por ingeniería y usar construcciones que comprenden citocinas inducibles. Las citocinas son potentes agonistas inmunitarios, lo que las lleva a ser consideradas agentes terapéuticos prometedores para la oncología. Sin embargo, las citocinas demostraron tener una ventana terapéutica muy limitada. Las citocinas tienen una semivida sérica corta y también se consideran muy potentes. En consecuencia, la administración terapéutica de citocinas produjo efectos sistémicos y toxicidades indeseables. Estas se vieron exacerbadas por la necesidad de administrar grandes cantidades de citocina para lograr los niveles deseados de citocina en el sitio previsto de acción de las citocinas (por ejemplo, un tumor). Desafortunadamente, debido a la biología de las citocinas y la incapacidad para dirigirse y controlar eficazmente su actividad, las citocinas no lograron las ventajas clínicas esperadas en el tratamiento de tumores.

En la presente se describen proteínas de fusión que superan la toxicidad y los problemas de semivida corta que han limitado gravemente el uso clínico de las citocinas en oncología. Las proteínas de fusión contienen polipéptidos de citocina que tienen actividad agonista del receptor. Pero, en el contexto de la proteína de fusión, la actividad agonista del receptor de citocina se atenúa y se extiende la semivida circulante. Las proteínas de fusión incluyen sitios de escisión por proteasa, que son escindidos por proteasas que están asociadas con un sitio deseado de actividad de citocina (p. ej., un tumor) y típicamente están enriquecidas o presentes selectivamente en el sitio de actividad deseada. Por lo tanto, las proteínas de fusión se escinden preferencial (o selectivamente) y eficazmente en el sitio de actividad deseado para limitar sustancialmente la actividad de

las citocinas al sitio de actividad deseado, tal como el microambiente tumoral. La escisión por la proteasa en el sitio de actividad deseado, como en un microambiente tumoral, libera una forma de la citocina de la proteína de fusión que es mucho más activa como agonista del receptor de citocina que la proteína de fusión (típicamente al menos aproximadamente 100 veces más activa que la proteína de fusión). La forma de la citocina que se libera tras la escisión de la proteína de fusión tiene típicamente una semivida corta, que a menudo es sustancialmente similar a la semivida de la citocina natural, lo que restringe aún más la actividad de las citocinas al microambiente tumoral. Aunque se extienda la semivida de la proteína de fusión, la toxicidad se reduce o elimina drásticamente porque la proteína de fusión circulante se atenúa y la citocina activa se dirige al microambiente tumoral. Las proteínas de fusión descritas en la presente, por primera vez, permiten la administración de una dosis terapéutica eficaz de una citocina para tratar tumores con la actividad de la citocina sustancialmente limitada al microambiente tumoral y se reducen o eliminan drásticamente los efectos sistémicos no deseados y la toxicidad de la citocina. Las proteínas de fusión son como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos, anotaciones y otra terminología científica utilizados en la presente se pretende que tengan el significado que le otorgaría comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente para mayor claridad y/o para una fácil referencia, y la inclusión de tales definiciones en la presente no debe interpretarse necesariamente como que representa una diferencia con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica. Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente son generalmente bien entendidos y comúnmente empleados usando metodologías convencionales por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4^a ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Según corresponda, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles comercialmente se llevan a cabo generalmente de acuerdo con los protocolos y condiciones definidos por el fabricante, a menos que se indique lo contrario.

"Citocina" es un término de la técnica bien conocido que se refiere a cualquier clase de proteínas inmunorreguladoras (como interleucina o interferón) que son secretadas por células especialmente del sistema inmunitario y que son moduladores del sistema inmunitario. Los polipéptidos de citocina que se pueden usar en proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento transformantes, tales como TGF- α y TGF- β (por ejemplo, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3); interferones, tales como interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interferón-kappa e interferón-omega; interleucinas, tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21 e IL-25; factores de necrosis tumoral, tales como factor de necrosis tumoral alfa y linfotóxina; quimiocinas (p. ej., quimiocina 10 con motivo C-X-C (CXCL10), CCL19, CCL20, CCL21) y factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), así como fragmentos de dichos polipéptidos que activan los receptores afines de la citocina (es decir, fragmentos funcionales de los anteriores). "Quimiocina" es un término de la técnica que se refiere a cualquiera de una familia de citocinas pequeñas con la capacidad de inducir quimiotaxis dirigida en células respondedoras cercanas. Los polipéptidos de fusión que no comprenden un polipéptido de IL-2 no están englobados por la redacción de las reivindicaciones.

Es bien sabido que las citocinas tienen una semivida sérica corta que, con frecuencia, es de unos pocos minutos u horas. Incluso las formas de citocinas que tienen secuencias de aminoácidos alteradas destinadas a extender la semivida sérica, pero que retienen la actividad agonista del receptor, también suelen tener semividas séricas cortas. Como se usa en la presente, una "citocina de semivida corta" se refiere a una citocina que tiene una semivida sustancialmente breve que circula en el suero de un sujeto, como una semivida sérica que es menor de 10, menor de 15, menor de 30, menor de 60, menor de 90, menor de 120, menor de 240 o menor de 480 minutos. Como se usa en la presente, una citocina de semivida corta incluye citocinas que no se han modificado en su secuencia para lograr una semivida más larga de lo habitual en el cuerpo de un sujeto y polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas destinadas a extender la semivida sérica, pero que retienen la actividad agonista del receptor. Típicamente un polipéptido de citocina de semivida corta, tal como un polipéptido de IL-2 tiene una semivida sérica que es comparable a la de la IL-2 de origen natural, p. ej. dentro de 5 veces, 4 veces, 3 veces o 2 veces la de la IL-2 de origen natural. Este último caso no pretende incluir la adición de dominios proteicos heterólogos, como un elemento de extensión de la semivida auténtico, como la albúmina sérica.

Las "sortasas" son transpeptidasas que modifican proteínas reconociendo y escindiendo una señal de clasificación carboxilo-terminal integrada en o unida terminalmente a una proteína o péptido objetivo. La sortasa A cataliza la escisión del motivo LPXTG (SEQ. ID NO: 125) (donde X es cualquier aminoácido estándar) entre el residuo Thr y Gly en la proteína objetivo, con unión transitoria del residuo Thr al residuo Cys del sitio activo en la enzima, formando un intermedio de enzima-tioacilo. Para completar la transpeptidación y crear el conjugado de monómero-péptido, una biomolécula con un grupo nucleófilo N-terminal, típicamente un motivo de oligopéptido, ataca al intermedio, desplazando la Sortasa A y uniendo las dos moléculas.

Como se usa en la presente, el término "bloqueador estérico" se refiere a un polipéptido o resto polipeptídico que puede unirse covalentemente a un polipéptido de citocina directa o indirectamente a través de otros restos tales como enlazadores, por ejemplo, en forma de polipéptido quimérico (proteína de fusión), pero por lo demás no se une covalentemente al polipéptido de citocina. Un bloqueador estérico puede unirse de forma no covalente al polipéptido de citocina, por ejemplo, mediante enlaces electrostáticos, hidrófobos, iónicos o de hidrógeno. Un bloqueador estérico típicamente inhibe o bloquea la actividad del resto de citocina debido a su proximidad al resto de citocina y tamaño comparativo. Un bloqueador estérico también puede bloquear en virtud del reclutamiento de un gran miembro de unión a proteínas. Un ejemplo de esto es un anticuerpo que se une a la albúmina sérica; mientras que el propio anticuerpo puede o no ser suficientemente grande para bloquear la activación o la unión por sí solo, el reclutamiento de albúmina permite un bloqueo estérico suficiente.

Como se usa y describe en la presente, un "elemento de extensión de la semivida" es una parte del polipéptido quimérico que aumenta la semivida sérica y mejora la pK, por ejemplo, al alterar su tamaño (por ejemplo, para estar por encima del límite de filtración renal), forma, radio hidrodinámico, carga o parámetros de absorción, biodistribución, metabolismo y eliminación.

Como se usa en la presente, los términos "activable", "activar", "inducir" e "inducible" se refieren a la capacidad de una proteína, es decir, una citocina, que es parte de una proteína de fusión, para unirse a su receptor y realizar actividad después de la escisión de elementos adicionales de la proteína de fusión

Como se usa en la presente, "plásmidos" o "vectores virales" son agentes que transportan los ácidos nucleicos descritos a la célula sin degradación e incluyen un promotor que produce la expresión de la molécula de ácido nucleico y/o polipéptido en las células a las que se administra.

Como se usan en la presente, los términos "péptido", "polipéptido" o "proteína" se usan ampliamente para significar dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La proteína, el péptido y el polipéptido también se usan en la presente indistintamente para referirse a secuencias de aminoácidos. Debe reconocerse que el término polipéptido no se usa en la presente para sugerir un tamaño o número particular de aminoácidos que comprenden la molécula y que un péptido puede contener hasta varios residuos de aminoácidos o más.

Como se usa en todas partes, "sujeto" puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, gato, perro, vaca, cerdo, oveja, cabra, ratón, conejo, rata y cobaya), aves, reptiles, anfibios, peces y cualquier otro animal. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende cubrir a sujetos adultos y recién nacidos, ya sean machos o hembras.

Como se usa en la presente, "paciente" o "sujeto" pueden usarse indistintamente y pueden referirse a un sujeto con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

Como se usa en la presente, los términos "tratamiento", "tratar" o "tratando" se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o afección o síntoma de la enfermedad o afección. Por lo tanto, en el método descrito, el tratamiento puede referirse a la reducción en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o sustancialmente por completo de la gravedad de una enfermedad o afección establecida o síntoma de la enfermedad o afección. Por ejemplo, un método para tratar una enfermedad se considera un tratamiento si hay una reducción del 10 % en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con un control. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier reducción porcentual entre el 10 % y el 100 % en comparación con niveles nativos o de control. Se entiende que el tratamiento no se refiere necesariamente a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección o síntomas de la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, los términos "prevención", "prevenir" y "previniendo" una enfermedad o trastorno se refieren a una acción, por ejemplo, la administración del polipéptido quimérico o la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico, que ocurre antes o aproximadamente al mismo tiempo en que un sujeto comienza a mostrar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, lo que inhibe o retrasa la aparición o exacerbación de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente, las referencias a "disminuir", "reducir" o "inhibir" incluyen un cambio de al menos aproximadamente un 10 %, de al menos aproximadamente un 20 %, de al menos aproximadamente un 30 %, de al menos aproximadamente un 40 %, de al menos aproximadamente un 50 %, de al menos aproximadamente un 60 %, de al menos aproximadamente un 70 %, de al menos aproximadamente un 80 %, de al menos aproximadamente un 90 % o más en comparación con un nivel de control adecuado. Dichos términos pueden incluir, pero no necesariamente incluyen, la eliminación completa de una función o propiedad,

como la actividad agonista.

Un "agonista de receptor de citocina atenuado" es un agonista de receptor de citocina que tiene una actividad agonista de receptor disminuida en comparación con el agonista de origen natural del receptor de citocina. Un agonista de citocina atenuado puede tener al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 1.000 veces o menos actividad agonista en comparación con el agonista natural del receptor. Cuando una proteína de fusión que contiene un polipéptido de citocina como se describe en la presente se describe como "atenuada" o que tiene "actividad atenuada", se quiere decir que la proteína de fusión es un agonista del receptor de citocina atenuado

Una "proteína de fusión intacta" es una proteína de fusión en la que no se ha eliminado ningún dominio, por ejemplo, mediante escisión por proteasa. Un dominio puede eliminarse mediante escisión por proteasa u otra actividad enzimática, pero cuando la proteína de fusión está "intacta", esto no ha ocurrido.

Como se usa en la presente, "resto" se refiere a una parte de una molécula que tiene una función distinta dentro de esa molécula, y esa función puede ser realizada por ese resto en el contexto de otra molécula. Un resto puede ser una entidad química con una función particular o una parte de una molécula biológica con una función particular. Por ejemplo, un "resto de bloqueo" dentro de una proteína de fusión es una parte de la proteína de fusión que es capaz de bloquear la actividad de algunos o todos los polipéptidos de fusión. Este puede ser un dominio de proteína, como la albúmina sérica. El bloqueo se puede lograr mediante un bloqueador estérico o un bloqueador específico. Un bloqueador estérico bloquea en virtud del tamaño y la posición y no se basa en una unión específica; un ejemplo es la albúmina sérica. Un bloqueador específico bloquea en virtud de interacciones específicas con el resto a bloquear. Un bloqueador específico debe adaptarse a la citocina o al dominio activo en particular; se puede utilizar un bloqueador estérico independientemente de la carga útil, siempre que sea lo suficientemente grande. En los polipéptidos de fusión de la invención, el resto de bloqueo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-2.

En general, el uso terapéutico de las citocinas está fuertemente limitado por su toxicidad sistémica. El TNF, por ejemplo, fue descubierto originalmente por su capacidad de inducir la necrosis hemorrágica de algunos tumores, y por su efecto citotóxico *in vitro* en diferentes líneas tumorales, pero posteriormente demostró tener una fuerte actividad proinflamatoria, que puede, en caso de condiciones de sobreproducción, afectar peligrosamente al cuerpo humano. Dado que la toxicidad sistémica es un problema fundamental con el uso de cantidades farmacológicamente activas de citocinas en los seres humanos, se están evaluando nuevos derivados y estrategias terapéuticas, dirigidas a reducir los efectos tóxicos de esta clase de efectores biológicos manteniendo su eficacia terapéutica.

La IL-2 ejerce funciones tanto estimulantes como reguladoras en el sistema inmunitario y es, junto con otros miembros de la familia de citocinas de la cadena γ común (γ_c), fundamental para la homeostasis inmunitaria. La IL-2 media su acción al unirse a los receptores de IL-2 (IL-2R), que consisten en receptores triméricos compuestos de las cadenas IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ (γ_c , CD132) o IL-2R $\beta\gamma$ dimericos (1, 3). Ambas variantes de IL-2R pueden transmitir señales tras la unión de IL-2. Sin embargo, los IL-2R $\alpha\beta\gamma$ triméricos tienen una afinidad aproximadamente 10-100 veces mayor por la IL-2 que los IL-2R $\beta\gamma$ dimericos (3), lo que implica que CD25 confiere unión de alta afinidad de IL-2 a su receptor, pero no es crucial para la transducción de señales. Los IL-2R triméricos se encuentran en los linfocitos T activados y linfocitos reguladores T (Treg) CD4+ caja cabeza de tenedor P3 (FoxP3)+, que son sensibles a la IL-2 *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, las células CD8+ experimentadas con antígenos (memoria), CD8+ de fenotipo CD44 con alta memoria (MP, por sus siglas en inglés) y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) están dotados de altos niveles de IL-2R $\beta\gamma$ dimericos, y estas células también responden vigorosamente a IL-2 *in vitro* e *in vivo*.

La expresión del IL-2R de alta afinidad es fundamental para que los linfocitos T respondan a concentraciones bajas de IL-2 que está disponible transitoriamente *in vivo*. La expresión de IL-2R α está ausente en los linfocitos T vírgenes y con memoria, pero se induce después de la activación con el antígeno. IL-2R β se expresa constitutivamente por linfocitos T CD8+ de memoria, NK y NKT pero también se induce en linfocitos T vírgenes después de la activación con el antígeno. γ_c está regulado de forma mucho menos estricta y es expresado constitutivamente por todas las células linfoides. Una vez que el antígeno induce el IL-2R de alta afinidad, la señalización del IL-2R regula al aumento al alza la expresión de IL-2R α en parte a través de la regulación de la transcripción de IL2ra dependiente de Stat5 (Kim et al., 2001). Este proceso representa un mecanismo para mantener la expresión de IL-2R de alta afinidad y mantener la señalización de IL-2 mientras quede una fuente de IL-2.

La IL-2 es capturada por IL-2R α a través de una gran superficie de unión hidrófoba rodeada por una periferia polar que da como resultado una interacción relativamente débil (Kd 10–8 M) con una rápida cinética de unión alternante. Sin embargo, el complejo binario IL-2R α -IL-2 conduce a un cambio conformacional muy pequeño en IL-2 que promueve la asociación con IL-2R β a través de una interacción polar distinta entre IL-2 e IL-2R β . La afinidad del complejo trimérico IL2/ α/β (es decir, Kd -300 pM) pseudoalta indica claramente que el complejo

trimérico es más estable que la IL2 unida a la cadena α sola ($K_d = 10$ nM) o a la cadena β sola ($K_d = 450$ nM) como muestran los datos de Ciardelli. En cualquier caso, el trímero IL2/ α/β recluta luego la cadena γ en el complejo cuaternario capaz de señalizar, lo que se ve facilitado por el gran sitio de unión compuesto en la cadena β unida a IL2 para la cadena γ .

5 En otras palabras, el complejo ternario IL-2R α -IL-2R β -IL-2 luego recluta γ a través de una interacción débil con IL-2 y una interacción más fuerte con IL-2R β para producir un IL-2R cuaternario estable de alta afinidad (K_d 10-11 M que es 10 pM). La formación del complejo IL-2-IL-2R cuaternario de alta afinidad conduce a la transducción de señales a través de las tirosinas quinasas Jak1 y Jak3, que están asociadas con IL-2R β e γ ,
10 respectivamente (Nelson y Willerford, 1998). El complejo IL-2-IL-2R cuaternario se internaliza rápidamente, donde IL-2, IL-2R β e γ se degradan rápidamente, pero IL-2R α se recicla a la superficie celular (Hémar et al., 1995; Yu y Malek, 2001). Por lo tanto, aquellas actividades funcionales que requieren una señalización sostenida de IL-2R requieren una fuente continua de IL-2 para acoplar IL-2R α y formar complejos de señalización de IL-2-IL-2R adicionales.

15 Los linfocitos T reguladores suprimen activamente la activación del sistema inmunitario y previenen la autorreactividad patológica y la consiguiente enfermedad autoinmune. El desarrollo de fármacos y métodos para activar selectivamente los linfocitos T reguladores para el tratamiento de enfermedades autoinmunes es objeto de una intensa investigación y, hasta el desarrollo de la presente invención, que puede administrar selectivamente IL-2 activa en el sitio de la inflamación, no ha tenido mucho éxito. Los linfocitos T reguladores (Treg) son una clase de linfocitos T CD4+CD25+ que suprimen la actividad de otras células inmunitarias. Los Treg son fundamentales para la homeostasis del sistema inmunitario y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia a los autoantígenos y en la modulación de la respuesta inmunitaria a los antígenos extraños. Se ha demostrado que múltiples enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluida la
20 diabetes tipo 1 (DT1), el lupus eritematoso sistémico (LES) y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) tienen una deficiencia en el número de linfocitos Treg o en la función de Treg.

En consecuencia, existe un gran interés en el desarrollo de terapias que refuercen el número y/o la función de los linfocitos Treg. Un enfoque de tratamiento para las enfermedades autoinmunes que se está investigando
30 es el trasplante de linfocitos Treg autólogos expandidos ex vivo (Tang, Q., et al, 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 3: 1-15). Si bien este enfoque ha mostrado ser prometedor en el tratamiento de modelos animales de enfermedad y en varios ensayos clínicos en humanos en etapas iniciales, requiere un tratamiento personalizado con los propios linfocitos T del paciente, es invasivo y técnicamente complejo. Otro enfoque es el tratamiento con dosis bajas de interleucina-2 (IL-2). Los linfocitos Treg expresan característicamente altos
35 niveles constitutivos del receptor de IL-2 de alta afinidad, IL2R $\alpha\beta\gamma$, que está compuesto por las subunidades IL2R α (CD25), IL2R β (CD122) e IL2R γ (CD132), y se ha mostrado que el crecimiento de los linfocitos Treg es dependiente de IL-2 (Malek, T.R., et al., 2010, Immunity, 33: 153-65).

A la inversa, la activación inmune también se ha logrado usando IL-2, y se ha aprobado la IL-2 recombinante (Proleukin®) para tratar ciertos cánceres. La IL-2 en dosis altas se usa para el tratamiento de pacientes con
40 melanoma metastásico y carcinoma de células renales metastásico con un impacto a largo plazo en la supervivencia global.

Los ensayos clínicos de tratamiento con dosis bajas de IL-2 de la EICH crónica (Koreth, J., et al., 2011, N Engl J Med., 365: 2055-66) y pacientes con vasculitis autoinmune asociada al VHC (Saadoun, D., et al., 2011, N Engl J Med., 365: 2067-77) han demostrado niveles aumentados de Treg y signos de eficacia clínica. Se han iniciado nuevos ensayos clínicos que investigan la eficacia de IL-2 en muchas otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La razón para usar la llamada IL-2 de dosis baja fue aprovechar la alta afinidad de IL-2 del receptor de IL-2 trimérico que se expresa de manera constitutiva en Treg, mientras que deja otros
50 linfocitos T que no expresan el receptor de alta afinidad en el estado inactivado. La aldesleucina (comercializada como Proleukin® por Prometheus Laboratories, San Diego, CA), la forma recombinante de IL-2 utilizada en estos ensayos, está asociada con una alta toxicidad. La aldesleucina está aprobada para el tratamiento del melanoma metastásico y el cáncer renal metastásico, pero sus efectos secundarios son tan graves que solo se recomienda su uso en un entorno hospitalario con acceso a cuidados intensivos (dirección web: www.proleukin.com/assets/pdf/proleukin.pdf).
55

Los ensayos clínicos de IL-2 en enfermedades autoinmunes han empleado dosis más bajas de IL-2 para dirigirse a los linfocitos Treg, porque los linfocitos Treg responden a concentraciones más bajas de IL-2 que muchos otros tipos de células inmunes debido a su expresión de IL2R alfa (Klatzmann D, 2015 Nat Rev Immunol. 15: 283-94). Sin embargo, incluso estas dosis más bajas dieron como resultado problemas de seguridad y tolerabilidad, y los tratamientos utilizados han empleado inyecciones subcutáneas diarias, ya sea de forma crónica o en ciclos de tratamiento intermitente de 5 días. Por lo tanto, existe la necesidad de una terapia de enfermedades autoinmunes que potencie el número y la función de los linfocitos Treg, que se dirija a los linfocitos Treg más específicamente que la IL-2, que sea más segura y más tolerable y que se administre
60 con menos frecuencia.
65

Un enfoque que se ha sugerido para mejorar el índice terapéutico de la terapia basada en IL-2 para enfermedades autoinmunes es usar variantes de IL-2 que son selectivas para los linfocitos Treg en relación con otras células inmunes. Los receptores de IL-2 se expresan en una variedad de diferentes tipos de células inmunitarias, que incluyen linfocitos T, células NK, eosinófilos y monocitos, y este patrón de expresión amplio probablemente contribuye a su efecto pleiotrópico sobre el sistema inmunitario y alta toxicidad sistémica. En particular, los linfocitos T efectores activados expresan IL2R $\alpha\beta\gamma$, al igual que las células epiteliales pulmonares. Pero, la activación de los linfocitos T efectores va directamente en contra del objetivo de modular a la baja y controlar una respuesta inmune, y la activación de las células epiteliales pulmonares conduce a efectos secundarios conocidos que limitan la dosis de IL-2, incluido el edema pulmonar. De hecho, el principal efecto secundario de la inmunoterapia con IL-2 en dosis altas es el síndrome de fuga vascular (VLS, por sus siglas en inglés), que conduce a la acumulación de líquido intravascular en órganos como los pulmones y el hígado con consiguiente edema pulmonar y daño de las células hepáticas. No existe ningún tratamiento para VLS que no sea la suspensión de IL-2. Sin embargo, se han probado regímenes de IL-2 en dosis bajas en pacientes para evitar el VLS a expensas de resultados terapéuticos subóptimos.

Según la bibliografía, se cree que el VLS es causado por la liberación de citocinas proinflamatorias de las células NK activadas por IL-2. Sin embargo, existe evidencia sólida de que el edema pulmonar es el resultado de la unión directa de IL-2 a las células endoteliales pulmonares, que expresan niveles bajos a intermedios de IL-2R $\alpha\beta\gamma$ funcionales. Y, el edema pulmonar asociado con la interacción de IL-2 con células endoteliales pulmonares se anuló bloqueando la unión a CD25 con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD25, en ratones huésped deficientes en CD25 o mediante el uso de complejos de IL-2 específica de CD122/mAb anti-IL-2 (IL-2/mAb), previniendo así el VLS.

El tratamiento con citocinas interleucina distintas de IL-2 ha sido más limitado. La IL-15 muestra una actividad estimuladora de células inmunes similar a la de IL-2, pero sin los mismos efectos inhibidores, lo que la convierte en un candidato inmunoterapéutico prometedor. Los ensayos clínicos de IL-15 humana recombinante para el tratamiento del melanoma maligno metastásico o el cáncer de células renales demostraron cambios apreciables en la distribución, proliferación y activación de las células inmunitarias y sugirieron una actividad antitumoral potencial (Conlon et al., 2014). La IL-15 se encuentra actualmente en ensayos clínicos para tratar diversas formas de cáncer. Sin embargo, se sabe que la terapia con IL-15 está asociada con efectos no deseados y tóxicos, como exacerbar ciertas leucemias, enfermedad de injerto contra huésped, hipotensión, trombocitopenia y daño hepático. (Mishra A., et al., Cance Cell, 2012, 22 (5): 645-55; Alpdogan O. et al., Blood, 2005, 105 (2): 866-73; Conlon KC et al., J Clin Oncol, 2015, 33 (1): 74-82).

El uso directo de IL-2 como agonista para unirse a la IL-2R y modular las respuestas inmunes terapéuticamente ha sido problemático debido a sus riesgos terapéuticos bien documentados, por ejemplo, su corta semivida sérica y alta toxicidad. Estos riesgos también han limitado el desarrollo terapéutico y el uso de otras citocinas. Se necesitan nuevas formas de citocinas que reduzcan estos riesgos. En la presente se describen composiciones y métodos que comprenden IL-2 e IL-15 y otras citocinas, fragmentos funcionales y muteínas de citocinas, así como citocinas condicionalmente activas diseñadas para abordar estos riesgos y proporcionar la terapia inmunomoduladora necesaria.

La presente invención está diseñada para abordar las deficiencias de la terapia directa con IL-2 usando restos de bloqueo de IL-2, polipéptidos que extienden la semivida sérica, polipéptidos dirigidos, polipéptidos de unión, incluyendo enlazadores escindibles por proteasa y combinaciones de los mismos. Las citocinas, incluidas interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 IL-23), interferones (IFN, incluidos IFN α , IFN β e IFN γ), factores de necrosis tumoral (p. ej., TNF α , linfotóxina), factores de crecimiento transformantes (p. ej., TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3), quimiocinas (quimiocina 10 con motivo C-X-C (CXCL10), CCL19, CCL20, CCL21) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CS) son muy potentes cuando se administran a pacientes. Como se usa en la presente, "quimiocina" significa una familia de pequeñas citocinas con la capacidad de inducir quimiotaxis dirigida en células respondedoras cercanas. Las citocinas pueden proporcionar una terapia potente, pero están acompañadas de efectos no deseados que son difíciles de controlar clínicamente y que han limitado el uso clínico de las citocinas. Esta descripción se refiere a nuevas formas de IL-2 que pueden usarse en pacientes con efectos no deseados reducidos o eliminados. En particular, esta descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos quiméricos (proteínas de fusión), ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión y formulaciones farmacéuticas de los anteriores que contienen un polipéptido de IL-2 que tiene una actividad de activación del receptor de IL-2 disminuida en comparación con la citocina correspondiente. Sin embargo, en condiciones seleccionadas o en un entorno biológico seleccionado, los polipéptidos quiméricos activan sus receptores afines, a menudo con la misma o mayor potencia que la citocina natural correspondiente. Como se describe en la presente, esto se logra típicamente usando un resto de bloqueo de IL-2 que bloquea o inhibe la función de activación del receptor de la citocina, fragmento activo o muteína de la misma en condiciones generales, pero no en condiciones seleccionadas, como las presentes en el sitio deseado de actividad de la citocina (por ejemplo, un sitio inflamatorio o un tumor).

Los polipéptidos quiméricos y los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos quiméricos se pueden

preparar usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido quimérico se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante, química sintética o combinaciones de estas técnicas, y se pueden expresar en un sistema de expresión adecuado, tal como en células CHO. Se pueden preparar polipéptidos quiméricos de forma similar, por ejemplo, mediante la expresión de un ácido nucleico adecuado, usando técnicas químicas sintéticas o semisintéticas y similares. En algunas realizaciones, el resto de bloqueo se puede unir al polipéptido de citocina mediante conjugación mediada por sortasa. Las "sortasas" son transpeptidasas que modifican proteínas reconociendo y escindiendo una señal de clasificación carboxi-terminal integrada en o unida terminalmente a una proteína o péptido objetivo. La sortasa A cataliza la escisión del motivo LPXTG (SEQ ID NO: 125) (donde X es cualquier aminoácido estándar) entre el residuo Thr y Gly en la proteína objetivo, con unión transitoria del residuo Thr al residuo Cys del sitio activo en la enzima, formando un intermedio enzima-tioacilo. Para completar la transpeptidación y crear el conjugado péptido-monómero, una biomolécula con un grupo nucleófilo N-terminal, típicamente un motivo de oligoglicina, ataca al intermedio, desplazando la Sortasa A y uniendo las dos moléculas.

Para formar la proteína de fusión citocina-resto de bloqueo, el polipéptido de citocina se marca primero en el extremo N con una secuencia de poliglicina, o alternativamente, en el extremo C con un motivo LPXTG (SEQ ID NO: 125). El resto de bloqueo u otro elemento tiene péptidos respectivos unidos que sirven como sitios aceptores para los polipéptidos marcados. Para la conjugación con dominios que llevan un péptido aceptor de LPXTG (SEQ ID NO: 125) unido a través de su extremo N, el polipéptido se marcará con una cadena de poliglicina N-terminal. Para la conjugación con el dominio que lleva un péptido de poliglicina unido a través de su extremo C, el polipéptido se marcará en su extremo C con una secuencia de reconocimiento de sortasa LPXTG (SEQ ID NO: 125). Al reconocer las secuencias de poliglicina y LPXTG (SEQ ID NO: 125), la sortasa formará un enlace peptídico entre polímero-péptido y polipéptidos marcados. La reacción de la sortasa elimina por escisión los residuos de glicina como productos intermedios y se produce a temperatura ambiente.

Se puede explotar una variedad de mecanismos para eliminar o reducir la inhibición causada por el resto de bloqueo. Las composiciones farmacéuticas incluyen un polipéptido de IL-2 y un resto de bloqueo con un enlazador escindible por proteasa que comprende un sitio de escisión de proteasa ubicado entre el resto de bloqueo de IL-2 y el polipéptido de IL-2 o dentro del resto de bloqueo de IL-2. Cuando se escinde el sitio de escisión de proteasa, el resto de bloqueo puede disociarse de la citocina, y la citocina puede activar entonces el receptor de citocina. Un resto de citocina también puede bloquearse mediante un resto de bloqueo específico, como un anticuerpo, que se une a un epítipo que se encuentra en la citocina relevante.

Puede utilizarse cualquier enlazador adecuado. Por ejemplo, el enlazador puede comprender glicina-glicina, un motivo de reconocimiento de sortasa, o un motivo de reconocimiento de sortasa y una secuencia peptídica $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO: 126) o $(Gly_3Ser)_n$ (SEQ ID NO: 127) en donde n es 1, 2, 3, 4 o 5. Típicamente, el motivo de reconocimiento de sortasa comprende una secuencia peptídica LPXTG (SEQ ID NO: 125), donde X es cualquier aminoácido. En algunos casos, el enlace covalente es entre un residuo de lisina reactivo unido al extremo C del polipéptido de citocina y un ácido aspártico reactivo unido al extremo N del bloqueador u otro dominio. En otros casos, el enlace covalente es entre un residuo de ácido aspártico reactivo unido al extremo N del polipéptido de citocina y un residuo de lisina reactivo unido al extremo C de dicho bloqueador u otro dominio.

Como se usa en la presente, un "bloqueador estérico" se refiere a un polipéptido o resto polipeptídico que puede unirse covalentemente a un polipéptido de citocina directa o indirectamente a través de otros restos tales como enlazadores, por ejemplo, en forma de polipéptido quimérico (proteína de fusión), pero de lo contrario, no se une covalentemente al polipéptido de citocina. Un bloqueador estérico puede unirse de forma no covalente al polipéptido de citocina, por ejemplo, mediante enlaces electrostáticos, hidrófobos, iónicos o de hidrógeno. Un bloqueador estérico típicamente inhibe o bloquea la actividad del resto de citocina debido a su proximidad al resto de citocina y tamaño comparativo. La inhibición estérica del resto de citocina puede eliminarse separando espacialmente el resto de citocina del bloqueador estérico, tal como escindiendo enzimáticamente una proteína de fusión que contiene un bloqueador estérico y un polipéptido de citocina en un sitio entre el bloqueador estérico y el polipéptido de citocina.

Como se describe con mayor detalle en la presente, la función de bloqueo puede combinarse con o deberse a la presencia de componentes funcionales adicionales en la composición farmacéutica, como un dominio de direccionamiento, un elemento de extensión de la semivida sérica y polipéptidos de unión escindibles por proteasa. Por ejemplo, un polipéptido que extiende la semivida sérica también puede ser un bloqueador estérico.

Varios elementos aseguran el suministro y la actividad de IL-2 preferentemente en el sitio de la actividad deseada de IL-2 y limitan severamente la exposición sistémica a la interleucina mediante una estrategia de bloqueo y opcionalmente de direccionamiento ligada a una estrategia de extensión de la semivida sérica. En esta estrategia de extensión de la semivida sérica, la versión bloqueada de la interleucina circula durante periodos prolongados (preferentemente 1-2 semanas o más), pero la versión activada tiene la semivida sérica típica de la interleucina.

En comparación con una versión extendida de semivida sérica, la semivida sérica de IL-2 administrada por vía intravenosa es solo de ~10 minutos debido a la distribución en el espacio extracelular corporal total, que es grande, ~15 L en un adulto de tamaño promedio. Posteriormente, la IL-2 es metabolizada por los riñones con una semivida de ~2.5 horas. (Smith, K. "Interleukin 2 immunotherapy". Therapeutic Immunology 240 (2001)). Según otras mediciones, la IL-2 tiene una semivida plasmática muy corta de 85 minutos para la administración intravenosa y 3.3 horas para la administración subcutánea (Kirchner, G.I., et al., 1998, Br J Clin Pharmacol. 46: 5-10). En algunas realizaciones de esta invención, el elemento de extensión de la semivida se une a la interleucina 2 a través de un enlazador que se escinde en el sitio de acción (por ejemplo, mediante proteasas específicas de inflamación o específicas de tumor) liberando la actividad completa de la interleucina en el sitio deseado y también separándola de la extensión de la semivida de la versión sin escindir. En tales realizaciones, la interleucina totalmente activa y libre tendría propiedades farmacocinéticas (pK) muy diferentes: una semivida de horas en lugar de semanas. Además, la exposición a la citocina activa se limita al sitio de la actividad de la citocina deseada (por ejemplo, un sitio inflamatorio o tumor) y se reduce la exposición sistémica a la citocina activa y la toxicidad y los efectos secundarios asociados.

Otras citocinas tienen una farmacología similar (p. ej., IL-15 según lo informado por Blood 2011 117: 4787-4795; doi: doi.org/10.1182/blood-2010-10-311456) como IL-2 y, en consecuencia, los diseños de esta descripción pueden usarse para abordar las deficiencias de usar estos agentes directamente y proporcionan polipéptidos quiméricos que pueden tener una semivida extendida y/o dirigirse a un sitio de actividad deseado (por ejemplo, un sitio de inflamación o un tumor). Sin embargo, en los polipéptidos de fusión de la invención, está presente un polipéptido de IL-2.

Si se desea, la IL-2 puede diseñarse por ingeniería para unirse al complejo de IL-2R en general o una de las tres subunidades de IL-2R específicamente con una afinidad que difiera de la de la IL-2 de tipo salvaje correspondiente, por ejemplo, para activar selectivamente Treg o Teff. Por ejemplo, los polipéptidos de IL-2 que se dice que tienen una mayor afinidad por la forma trimérica del receptor de IL-2 en relación con la forma dimerica beta/gamma del receptor de IL-2 en comparación con la IL-2 de tipo salvaje pueden tener una secuencia de aminoácidos que incluye uno de los siguientes conjuntos de mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 (una proteína IL-2 madura que comprende los aminoácidos 21-153 de IL-2 humana que tiene el número de acceso Uniprot P60568-1): (a) K64R, V69A, y Q74P; (b) V69A, Q74P, y T101A; (c) V69A, Q74P, e I128T; (d) N30D, V69A, Q74P, y F103S; (e) K49E, V69A, A73V, y K76E; (f) V69A, Q74P, T101A, y T133N; (g) N30S, V69A, Q74P, e I128A; (h) V69A, Q74P, N88D, y S99P; (i) N30S, V69A, Q74P, e I128T; (j) K9T, Q11R, K35R, V69A, y Q74P; (k) A1T, M46L, K49R, E61D, V69A, y H79R; (l) K48E, E68D, N71T, N90H, F103S, e I114V; (m) S4P, T10A, Q11R, V69A, Q74P, N88D, y T133A; (n) E15K, N30S Y31H, K35R, K48E, V69A, Q74P, e I92T; (o) N30S, E68D, V69A, N71A, Q74P, S75P, K76R, y N90H; (p) N30S, Y31C, T37A, V69A, A73V, Q74P, H79R, e I128T; (q) N26D, N29S, N30S, K54R, E67G, V69A, Q74P, e I92T; (r) K8R, Q13R, N26D, N30T, K35R, T37R, V69A, Q74P, e I92T; y (s) N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D, e I89V. Este enfoque también se puede aplicar para preparar muteínas de otras citocinas, incluidas las interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23), interferones (IFN, incluidos IFN α , IFN β e IFN γ), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF α , linfotoxina), factores de crecimiento transformantes (por ejemplo, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CS). Por ejemplo, se pueden preparar muteínas que tengan la afinidad de unión deseada por un receptor afín.

Como se indicó anteriormente, cualquiera de los polipéptidos de IL-2 mutantes descritos en la presente puede incluir las secuencias descritas; también pueden limitarse a las secuencias descritas y por lo demás idénticas a SEQ ID NO: 1. Además, cualquiera de los polipéptidos de IL-2 mutantes descritos en la presente puede incluir opcionalmente una sustitución del residuo de cisteína en la posición 125 por otro residuo (p. ej., serina) y/o puede incluir opcionalmente una delección del residuo de alanina en la posición 1 de SEQ ID. NO: 1.

Otro enfoque para mejorar el índice terapéutico de una terapia basada en IL-2 es optimizar la farmacocinética de la molécula para activar al máximo los linfocitos Treg. Los primeros estudios de la acción de IL-2 demostraron que la estimulación de IL-2 de la proliferación de linfocitos T humanos *in vitro* requería un mínimo de 5-6 horas de exposición a concentraciones efectivas de IL-2 (Cantrell, D.A., et al., 1984, Science, 224: 1312-1316). Cuando se administra a pacientes humanos, la IL-2 tiene una semivida plasmática muy corta de 85 minutos para la administración intravenosa y 3.3 horas para la administración subcutánea (Kirchner, G.I., et al., 1998, Br J Clin Pharmacol. 46: 5-10). Debido a su corta semivida, mantener la IL-2 circulante en o por encima del nivel necesario para estimular la proliferación de linfocitos T durante el tiempo necesario requiere dosis altas que resultan en niveles máximos de IL-2 significativamente por encima de la EC50 para los linfocitos Treg o requerirán administración frecuente. Estos altos niveles máximos de IL-2 pueden activar los receptores de IL2R $\beta\gamma$ y tener otros efectos no deseados o adversos, por ejemplo, VLS como se indicó anteriormente. Un análogo de IL-2, o una proteína multifuncional con IL-2 unida a un dominio que permite la unión al receptor FcRn, con una semivida circulante más larga que la IL-2, puede alcanzar una concentración de fármaco objetivo durante un período de tiempo específico a una dosis más baja que la IL-2 y con niveles máximos más bajos. Por lo tanto, tal análogo de IL-2 requerirá dosis más bajas o una administración menos frecuente que la IL-2 para estimular eficazmente los linfocitos Treg. La administración subcutánea menos frecuente de un fármaco

IL-2 también será más tolerable para los pacientes. Un agente terapéutico con estas características se traducirá clínicamente en una eficacia farmacológica mejorada, una toxicidad reducida y un mejor cumplimiento de la terapia por parte del paciente. Alternativamente, la IL-2 o las muteínas de IL-2 (en la presente, "IL-2*") pueden dirigirse selectivamente al sitio de acción pretendido (por ejemplo, sitios de inflamación). Este direccionamiento se puede lograr mediante una de varias estrategias, incluida la adición de dominios al agente administrado que comprenden bloqueadores de IL-2 (o muteínas) que se escinden o mediante dominios de direccionamiento o una combinación de los dos.

En algunas realizaciones, los agonistas parciales de IL-2* pueden adaptarse para unirse con mayor o menor afinidad dependiendo del objetivo deseado; por ejemplo, una IL-2* puede prepararse por ingeniería para unirse con afinidad mejorada a una de las subunidades del receptor y no a las otras. Estos tipos de agonistas parciales, a diferencia de los agonistas enteros o los antagonistas completos, ofrecen la capacidad de sintonizar las propiedades de señalización con una amplitud que provoca las propiedades funcionales deseadas sin alcanzar los umbrales de propiedades no deseadas. Dadas las actividades diferenciales de los agonistas parciales, se podría preparar por ingeniería un repertorio de variantes de IL-2 para exhibir un grado aún más fino de actividades de señalización distintivas, que varían desde agonismo casi total a parcial y hasta antagonismo completo.

En algunas realizaciones, la IL-2* tiene afinidad alterada por IL-2R α . En algunas realizaciones, la IL-2* tiene una mayor afinidad por IL-2R α que la IL-2 de tipo salvaje. En otras realizaciones, la IL-2* tiene afinidad alterada por IL-2R β . En una realización, la IL-2* tiene una afinidad de unión mejorada por IL-2R β , por ejemplo, el EXTREMO Nde IL-2R β , que elimina el requisito funcional de IL-2R α . En otra realización, se genera una IL-2* que tiene una afinidad de unión aumentada por IL-2R β pero que exhibió una unión disminuida a IL-2R γ y, por lo tanto, tiene heterodimerización y señalización de IL-2R $\beta\gamma$ defectuosas.

Los restos de bloqueo, descritos con más detalle a continuación, también se pueden usar para favorecer la unión o activación de uno o más receptores. En una realización, se añaden restos de bloqueo de modo que la unión o activación de IL-2R $\beta\gamma$ se bloquee, pero la unión o activación de IL-2R α no se cambie. En otra realización, se añaden restos de bloqueo de manera que se reduce la unión o activación de IL-2R α . En otra realización, se añaden restos de bloqueo de modo que se inhiba la unión a y la activación de todos los tres receptores. Este bloqueo puede liberarse mediante la eliminación de los restos de bloqueo en un entorno particular, por ejemplo, mediante la escisión proteolítica de un enlazador que une uno o más restos de bloqueo a la citocina.

Puede aplicarse un enfoque similar para mejorar otras citocinas, particularmente para su uso como agentes inmunoestimuladores, por ejemplo, para tratar el cáncer. Por ejemplo, en este aspecto, la farmacocinética y/o farmacodinamia de la citocina (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IFN α , IFN β y IFN γ , TNF α , linfotóxina, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, GM-CSF, CXCL10, CCL19, CCL20 y CCL21) se pueden adaptar para activar al máximo los linfocitos efectoros (p. ej., linfocitos T efectoros, linfocitos NK) y/o células que promueven la respuesta inmune citotóxica (por ejemplo, inducen la maduración de las células dendríticas) en un sitio de actividad deseado, tal como en un tumor, pero preferiblemente no sistémicamente. Los polipéptidos de fusión que no comprenden un polipéptido de IL-2 no están englobados por la expresión de las reivindicaciones, aunque se consideran útiles para la comprensión de la invención.

Por lo tanto, en la presente se describen composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido de citocina, como interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23), interferones (IFN, incluidos IFN α , IFN β e IFN γ), factores de necrosis tumoral (p. ej., TNF α , linfotóxina), factores de crecimiento transformantes (p. ej., TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3), quimiocinas (p. ej., CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CS) o un fragmento funcional o muteína de cualquiera de los anteriores. El polipéptido también incluye típicamente al menos una secuencia de aminoácidos enlazadora, en donde la secuencia de aminoácidos en ciertos casos es capaz de ser escindida por una proteasa endógena. En un caso, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos que comprende HSSKLQ (SEQ ID NO: 25), GPLGVRG (SEQ ID NO: 128), IPVSLRSG (SEQ ID NO: 129), VPLSLYSG (SEQ ID NO: 130), o SGESPAYTA (SEQ ID NO: 131). En otros casos, el polipéptido quimérico contiene además un resto de bloqueo, por ejemplo, un resto de polipéptido de bloqueo estérico, capaz de bloquear la actividad del polipéptido de interleucina. El resto de bloqueo, por ejemplo, puede comprender un dominio de unión de albúmina sérica humana (HSA) o un polietilenglicol (PEG) opcionalmente ramificado o de múltiples brazos. Alternativamente, la composición farmacéutica comprende un primer polipéptido de citocina o un fragmento del mismo, y un resto de bloqueo, por ejemplo, un resto de polipéptido de bloqueo estérico, en donde el resto de bloqueo bloquea la actividad del polipéptido de citocina en el receptor de citocina y en donde el resto de bloqueo en ciertos casos comprende un dominio escindible por proteasa. En algunos casos, el bloqueo y la reducción de la actividad de las citocinas se logra simplemente uniendo dominios adicionales con conectores muy cortos al extremo N o C del dominio de interleucina. En tales casos, se anticipa que el bloqueo se libere mediante la digestión con proteasa del resto de bloqueo o del enlazador corto que une el bloqueador a la interleucina. Una vez que el dominio se recorta o se libera, ya no podrá lograr el bloqueo de la actividad de las citocinas. En la invención, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad efectiva de un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de IL-2, un elemento de extensión de la semivida, un resto

de bloqueo y enlazadores peptídicos como se define en las reivindicaciones adjuntas, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 La composición farmacéutica, por ejemplo, polipéptido quimérico, puede comprender dos o más citocinas que deben incluir un polipéptido de IL-2, que pueden ser el mismo polipéptido de citocina o diferentes polipéptidos de citocina. Por ejemplo, los dos o más tipos diferentes de citocinas tienen funciones complementarias. En algunos ejemplos, una primera citocina es IL-2 y una segunda citocina es IL-12. En algunas realizaciones, cada uno de los dos o más tipos diferentes de polipéptidos de citocina tiene actividades que modulan la actividad de los otros polipéptidos de citocina. En algunos ejemplos de polipéptidos quiméricos que contienen dos
- 10 polipéptidos de citocina, un primer polipéptido de citocina activa los linfocitos T y un segundo polipéptido de citocinas no activa los linfocitos T. En algunos ejemplos de polipéptidos quiméricos que contienen dos polipéptidos de citocina, una primera citocina es un quimioatrayente, por ejemplo, CXCL10, y una segunda citocina es un activador de células inmunes.
- 15 Preferiblemente, los polipéptidos de citocina (incluidos los fragmentos funcionales) que se incluyen en las proteínas de fusión descritas en la presente no están mutados ni preparados por ingeniería para alterar las propiedades de la citocina de origen natural, incluida la afinidad y especificidad de unión al receptor o la semivida sérica. Sin embargo, los cambios en la secuencia de aminoácidos de las citocinas naturales (incluidas las de tipo salvaje) son aceptables para facilitar la clonación y lograr los niveles de expresión deseados, por
- 20 ejemplo.

Unión a CD25

- 25 A menudo se desaconseja la unión a CD25 en construcciones de IL-2 modificadas. Por el contrario, los polipéptidos de IL-2 descritos en la presente preferiblemente no se modifican para evitar la unión a CD25. Preferiblemente, los polipéptidos de IL-2 descritos en la presente se unen a CD25. Típicamente, las proteínas de fusión de IL-2 descritas en la presente son capaces de unirse a CD25 y el bloqueo de dirige a las interacciones con IL-2R beta y gamma (CD122 y CD132).

30 Resto de bloqueo

- El resto de bloqueo inhibe la capacidad del polipéptido de IL-2 de activar su receptor. Los polipéptidos de fusión que no comprenden un resto de bloqueo que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une al polipéptido de IL-2 no están englobados por la expresión de las reivindicaciones,
- 35 aunque se consideran útiles para la comprensión de la invención. Un resto de bloqueo puede inhibir la capacidad de la citocina para unirse y/o activar su receptor bloqueando estéricamente y/o mediante unión no covalente a la citocina. Los ejemplos de restos de bloqueo adecuados incluyen el fragmento o muteína de unión a citocina o de longitud completa del receptor afin de la citocina. También se pueden usar anticuerpos y fragmentos de los mismos que incluyen, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de nanocuerpo de tipo camélido (VHH), un dAb y similares que se unen a la citocina. También se pueden usar otros dominios de unión a antígenos adecuados que se unen a la citocina, que incluyen proteínas que no son inmunoglobulinas que imitan la unión y/o estructura de anticuerpos, tales como anticalinas, afilinas, moléculas afines, afímeros, afitinas, alfacerpos, avímeros, DARPinas, finómeros, péptidos de dominio kunitz, monocuerpos y dominios de unión basados en otros andamios preparados por ingeniería como SpA, GroEL, fibronectina, lipocalina y andamios CTLA4. Otros ejemplos de polipéptidos bloqueantes adecuados incluyen polipéptidos que inhiben o bloquean estéricamente la unión de la citocina a su receptor afin. Ventajosamente, dichos restos también pueden funcionar como elementos que prolongan la semivida. Por ejemplo, un péptido
- 40 que se modifica por conjugación con un polímero soluble en agua, como el PEG, puede inhibir estéricamente o prevenir la unión de la citocina a su receptor. También pueden usarse polipéptidos, o fragmentos de los mismos, que tienen semividas en suero largas, tales como albúmina sérica (albúmina sérica humana), inmunoglobulina Fc, transferrina y similares, así como fragmentos y muteínas de tales polipéptidos. Los anticuerpos y dominios de unión a antígenos que se unen, por ejemplo, a una proteína con una semivida sérica larga, como HSA, inmunoglobulina o transferrina, o a un receptor que se recicla a la membrana plasmática, como FcRn o receptor de transferrina, también inhiben la citocina, particularmente cuando se unen a su antígeno. Los ejemplos de tales polipéptidos de unión a antígeno incluyen un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de nanocuerpo de tipo camélido (VHH), un dAb y similares.
- 45 También se pueden usar otros dominios de unión a antígenos adecuados que se unen a la citocina, que incluyen proteínas que no son inmunoglobulinas que imitan la unión y/o estructura de anticuerpos, tales como anticalinas, afilinas, moléculas afines, afímeros, afitinas, alfacerpos, avímeros, DARPinas, finómeros, péptidos de dominio kunitz, monocuerpos y dominios de unión basados en otros andamios preparados por ingeniería como SpA, GroEL, fibronectina, lipocalina y andamios CTLA4.
- 50
- 55
- 60
- 65

En ejemplos ilustrativos, cuando IL-2 es la citocina en el polipéptido quimérico, el resto de bloqueo puede ser

el fragmento o muteína de longitud completa de la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R α) o beta (IL-2R β) o cadena gamma del receptor de IL-2 (IL-2R γ), un anticuerpo de dominio único anti-IL-2 (dAb) o scFv, un Fab, un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo, y dAb o scFv anti-HAS, y similares.

5 **Elementos de extensión de la semivida in vivo**

Los polipéptidos quiméricos comprenden un elemento de extensión de la semivida in vivo. El aumento de la semivida in vivo de moléculas terapéuticas con semividas naturalmente cortas permite un régimen de dosificación más aceptable y manejable sin sacrificar la eficacia. Como se usa en la presente, un "elemento de extensión de la semivida" es una parte del polipéptido quimérico que aumenta la semivida in vivo y mejora la pK, por ejemplo, alterando su tamaño (por ejemplo, para estar por encima del límite de filtración renal), forma, radio hidrodinámico, carga o parámetros de absorción, biodistribución, metabolismo y eliminación. Una forma ejemplar de mejorar la pK de un polipéptido es mediante la expresión de un elemento en la cadena polipeptídica que se une a los receptores que se reciclan a la membrana plasmática de las células en lugar de degradarse en los lisosomas, como el receptor FcRn en las células endoteliales y el receptor de transferrina. Tres tipos de proteínas, por ejemplo, IgG humana, HSA (o fragmentos) y transferrina, persisten en el suero humano durante mucho más tiempo de lo que se podría predecir solo por su tamaño, que es una función de su capacidad para unirse a receptores que se reciclan en lugar de degradarse en el lisosoma. Estas proteínas, o fragmentos de ellas que retienen la unión de FcRn, se ligan de forma rutinaria a otros polipéptidos para extender su semivida sérica. En una realización, el elemento de extensión de la semivida es un dominio de unión a albúmina sérica humana (HSA). La HSA (SEQ ID NO: 2) también puede unirse directamente a las composiciones farmacéuticas o unirse mediante un enlazador corto. También se pueden usar fragmentos de HSA. La HSA y sus fragmentos pueden funcionar tanto como un resto de bloqueo como un elemento de extensión de la semivida. Los fragmentos Fc y IgG humanos también pueden realizar una función similar. Los polipéptidos de fusión que no comprenden un elemento de extensión de la semivida que es albúmina de suero humano, o un polipéptido de unión a antígeno que se une a la albúmina de suero humano, no están englobados por la expresión de las reivindicaciones, aunque se consideran útiles para la comprensión de la invención.

El elemento de extensión de la semivida sérica también puede ser un polipéptido de unión a antígeno que se une a una proteína con una semivida sérica larga, tal como albúmina sérica, transferrina y similares. Los ejemplos de dichos polipéptidos incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos que incluyen, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de nanocuerpo de tipo camélido (VHH), un dAb y similares. Otros dominios de unión a antígenos adecuados incluyen proteínas que no son inmunoglobulinas que imitan la unión y/o estructura de anticuerpos tales como anticlinas, afiliaciones, moléculas afines, afímeros, affitinas, alfacuerpos, avímeros, DARPinas, finómeros, péptidos de dominio kunitz, monocuerpos y dominios de unión basado en otros andamios preparados por ingeniería como los andamios SpA, GroEL, fibronectina, lipocalina y CTLA4. Otros ejemplos de polipéptidos que se unen a antígenos incluyen un ligando para un receptor deseado, una parte de un receptor que se une al ligando, una lectina y péptidos que se unen o se asocian con uno o más antígenos diana.

Algunos elementos de extensión de la semivida sérica preferidos son polipéptidos que comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDR) y opcionalmente bucles sin CDR. Ventajosamente, tales elementos de extensión de la semivida sérica pueden extender la semivida sérica de la citocina y también funcionar como inhibidores de la citocina (por ejemplo, mediante bloqueo estérico, interacción no covalente o una combinación de los mismos) y/o como dominios de direccionamiento. En algunos casos, los elementos de extensión de la semivida sérica son dominios derivados de una molécula de inmunoglobulina (molécula de Ig) o andamios de proteínas preparados por ingeniería que imitan la estructura de anticuerpos y/o la actividad de unión. La Ig puede ser de cualquier clase o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, etc.). Una cadena polipeptídica de una molécula de Ig se pliega en una serie de cadenas beta paralelas unidas por bucles. En la región variable, tres de los bucles constituyen las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) que determinan la especificidad de unión al antígeno de la molécula. Una molécula de IgG comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con una hipervariable en secuencia y/o involucrada en el reconocimiento de antígeno y/o usualmente forman bucles definidos estructuralmente, intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En algunas realizaciones de esta descripción, al menos algunas o todas las secuencias de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 y FR4 son parte del "bucle sin CDR" de los restos de unión

descritos en la presente. Como se muestra en la Fig. 5, un dominio variable de una molécula de inmunoglobulina tiene varias cadenas beta que están dispuestas en dos hojas. Los dominios variables de las cadenas de inmunoglobulinas ligeras y pesadas contienen tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). Las tres CDR de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son los bucles que conectan las cadenas beta B-C, C'-C" y F-G del pliegue de inmunoglobulina, mientras que los bucles inferiores que conectan las cadenas beta AB, CC', C"-D y E-F del pliegue de inmunoglobulina y el bucle superior que conecta las cadenas D-E del pliegue de inmunoglobulina son los bucles sin CDR. En algunas realizaciones de esta descripción, al menos algunos residuos de aminoácidos de un dominio constante, CH1, CH2 o CH3, son parte del "bucle sin CDR" de los restos de unión descritos en la presente. Los bucles sin CDR comprenden, en algunas realizaciones, uno o más bucles AB, CD, EF y DE de un dominio del conjunto C1 de una molécula de Ig o similar a Ig; bucles AB, CC', EF, FG, BC y EC' de un dominio del conjunto C2 de una molécula de Ig o similar a Ig; DE, BD, GF, A(A1A2)B y bucles EF del dominio del conjunto I (intermedio) de una molécula de Ig o similar a Ig.

Dentro del dominio variable, se cree que las CDR son responsables del reconocimiento y la unión del antígeno, mientras que los residuos de FR se consideran un andamio para las CDR. Sin embargo, en ciertos casos, algunos de los residuos de FR juegan un papel importante en el reconocimiento y la unión del antígeno. Los residuos de la región marco que afectan la unión de Ag se dividen en dos categorías. Los primeros son residuos de FR que entran en contacto con el antígeno, por lo que son parte del sitio de unión, y algunos de estos residuos tienen una secuencia cercana a las CDR. Otros residuos son aquellos que están lejos de las CDR en secuencia, pero están muy próximos a él en la estructura tridimensional de la molécula, *por ejemplo*, un bucle en la cadena pesada. El dominio de extensión de la semivida sérica (por ejemplo, un dominio que comprende CDR) puede comprender al menos un bucle sin CDR. En algunos casos, un bucle sin CDR proporciona un sitio de unión para unirse a una citocina, proteína sérica en masa u otro antígeno diana.

El elemento de extensión de la semivida sérica, además o alternativamente de contener CDR, comprende un bucle sin CDR. En algunos casos, el bucle sin CDR se modifica para generar un sitio de unión al antígeno específico para un antígeno diana deseado, tal como una proteína sérica en masa, tal como albúmina, o para el resto de citocina u otro antígeno de direccionamiento. Se contempla que se pueden usar varias técnicas para modificar el bucle sin CDR, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, inserción de al menos un aminoácido que es extraño a la secuencia de aminoácidos del bucle sin CDR, sustitución de aminoácidos. Un péptido antígeno se inserta en un bucle sin CDR, en algunos ejemplos. En algunos ejemplos, un péptido antigénico se sustituye por el bucle sin CDR. La modificación, para generar un sitio de unión al antígeno, se realiza en algunos casos en un solo bucle sin CDR. En otros casos, se modifica más de un bucle sin CDR. Por ejemplo, la modificación está en cualquiera de los bucles sin CDR mostrados en la Fig. 5, es decir, AB, CC', C" D, EF y D-E. En algunos casos, la modificación está en el bucle DE. En otros casos, las modificaciones están en los cuatro bucles AB, CC', C"-D, E-F.

En algunos ejemplos, el elemento de extensión de la semivida sérica tiene una especificidad de unión dual y contiene CDR que se unen específicamente a proteínas en suero en masa, como la albúmina sérica, y bucles sin CDR que se unen y bloquean específicamente el dominio de citocina. En otros ejemplos, el elemento de extensión de la semivida sérica contiene CDR que se unen específicamente a un antígeno diana, como el dominio de citocina u otro antígeno diana, y bucles sin CDR que se unen específicamente a una proteína sérica en masa, como la albúmina sérica. Preferiblemente, el elemento de extensión de la semivida sérica inhibe la unión del dominio de citocina al receptor de citocina afín, por ejemplo, mediante oclusión estérica, mediante interacciones intermoleculares específicas o una combinación de ambos.

En algunas realizaciones, el elemento de extensión de la semivida sérica se une de manera no covalente directamente a la citocina e inhibe su actividad.

En ciertos ejemplos, el resto de unión se une a una citocina a través de uno o más bucles AB, CC', C" D y E-F y se une a una proteína de suero en masa, como la albúmina, a través de uno o más del bucle BC, C'C" y FG. En ciertos ejemplos, el resto de unión se une a una proteína sérica en masa, como la albúmina, a través de su bucle AB, CC', C" D o EF y se une a una citocina a través de su bucle BC, C'C" o FG. En ciertos ejemplos, el resto de unión se une a una proteína sérica en masa, como la albúmina, a través de su bucle AB, CC', C" D y EF y se une a una citocina a través de su bucle BC, C'C", y FG. En ciertos ejemplos, el resto de unión se une a una proteína sérica en masa, como la albúmina, a través de uno o más de los bucles AB, CC', C" D y E-F y se une a una citocina, a través de uno o más del bucle BC, C'C" y FG.

Los restos de unión son cualquier tipo de polipéptido. Por ejemplo, en ciertos casos, los restos de unión son péptidos naturales, péptidos sintéticos o andamios de fibronectina, o proteínas de suero en masa preparadas por ingeniería. La proteína sérica en masa comprende, por ejemplo, albúmina, fibrinógeno o una globulina. En algunas realizaciones, los restos de unión son andamios preparados por ingeniería. Los andamios preparados por ingeniería comprenden, por ejemplo, sdAb, un scFv, un Fab, un VHH, un dominio de fibronectina tipo III, un andamio similar a inmunoglobulina (como se sugiere en Halaby et al., 1999. Prot Eng 12 (7): 563-571), DARPin, péptido de nudo de cistina, lipocalina, andamio de haz de tres hélices, módulo de unión a albúmina

relacionada con la proteína G o andamio de aptámero de ADN o ARN.

En algunos casos, el elemento de extensión de la semivida sérica se une al dominio de citocina a través de sus bucles sin CDR y el dominio de citocina se conecta además a un dominio de direccionamiento como se describe en la presente. En algunos casos, el elemento de extensión de la semivida sérica comprende un sitio de unión para una proteína sérica en masa. En algunos casos, las CDR proporcionan el sitio de unión para la proteína sérica en masa. La proteína sérica en masa es, en algunos ejemplos, una globulina, albúmina, transferrina, IgG1, IgG2, IgG4, IgG3, monómero de IgA, factor XIII, fibrinógeno, IgE o IgM pentamérica. En algunos casos, las CDR forman un sitio de unión para una cadena ligera de inmunoglobulina, tal como una cadena ligera libre de Igk o una cadena ligera libre de Igl.

En la **Fig. 6** se muestra un ejemplo de proteína condicionalmente activa. En el ejemplo ilustrado, los bucles sin CDR en un dominio de unión a albúmina sérica (por ejemplo, un dAb) pueden formar un sitio de unión para la citocina IL-2. En este ejemplo, el sitio de unión para la albúmina sérica puede estar formado por las CDR del dominio de unión a la albúmina sérica.

El elemento de extensión de la semivida sérica puede ser cualquier tipo de dominio de unión, que incluye, pero no se limita a, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el resto de unión es un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de nanocuerpos derivados de camélidos. En otras realizaciones, los restos de unión son dominios de unión que no son de Ig, es decir, miméticos de anticuerpos, tales como anticalinas, afilinas, moléculas afines, afímeros, affitinas, alfacuerpos, avímeros, DARPinas, finómeros, péptidos de dominio kunitz y monocuerpos.

En otros casos, el elemento de extensión de la semivida sérica puede ser un polímero soluble en agua o un péptido que está conjugado con un polímero soluble en agua, tal como PEG. "PEG", "polietilenglicol" y "polietilen glicol)", como se usan en la presente, son intercambiables y abarcan cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua no peptídico. El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50 %, de subunidades repetidas $-OCH_2CH_2-$. Con respecto a las formas específicas, el PEG puede tomar cualquier número de una variedad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías tales como "ramificado", "lineal", "bifurcado", "multifuncional" y similares, que se describirán con mayor detalle a continuación. El PEG no se limita a una estructura particular y puede ser lineal (por ejemplo, un grupo terminal protegido, por ejemplo, alcoxi PEG o un PEG bifuncional), ramificado o con múltiples brazos (por ejemplo, PEG bifurcado o PEG unido a un núcleo de poliol), una arquitectura dendrítica (o en estrella), cada una con o sin uno o más enlaces degradables. Además, la estructura interna del PEG se puede organizar en cualquier número de patrones de repetición diferentes y se puede seleccionar del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alterno, copolímero aleatorio, copolímero de bloque, tripolímero alterno, tripolímero aleatorio y tripolímero de bloque. Los PEG se pueden conjugar con polipéptidos y péptidos mediante cualquier método adecuado. Normalmente, un derivado reactivo de PEG, como el PEG de éster de N-hidroxisuccinamido, se hace reaccionar con un péptido o polipéptido que incluye aminoácidos con una cadena lateral que contiene un grupo funcional amino, sulfhidrilo, ácido carboxílico o hidroxilo, como cisteína, lisina, asparagina, glutamina, teonina, tirosina, serina, ácido aspártico y ácido glutámico.

Dominios de direccionamiento y retención

Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable maximizar la cantidad de tiempo que la construcción está presente en su ubicación deseada en el cuerpo. Esto se puede lograr incluyendo un dominio adicional en el polipéptido quimérico (proteína de fusión) para influir en sus movimientos dentro del cuerpo. Por ejemplo, los ácidos nucleicos quiméricos pueden codificar un dominio que dirige el polipéptido a un lugar del cuerpo, por ejemplo, células tumorales o un lugar de inflamación; este dominio se denomina "dominio de direccionamiento" y/o codifica un dominio que retiene el polipéptido en una ubicación en el cuerpo, por ejemplo, células tumorales o un sitio de inflamación; este dominio se denomina "dominio de retención". En algunas realizaciones, un dominio puede funcionar tanto como dominio de retención como de direccionamiento. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento y/o el dominio de retención son específicos de un entorno rico en proteasas. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento codificado y/o el dominio de retención son específicos para los linfocitos T reguladores (Treg), por ejemplo, direccionando los receptores CCR4 o CD39. Otros dominios de direccionamiento y/o retención adecuados comprenden aquellos que tienen un ligando afín que se sobreexpresa en tejidos inflamados, por ejemplo, el receptor de IL-1 o el receptor de IL-6. En otras realizaciones, los dominios de direccionamiento y/o retención adecuados comprenden aquellos que tienen un ligando afín que está sobreexpresado en tejido tumoral, por ejemplo, Epcam, CEA o mesotelina. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento se une a la interleucina mediante un enlazador que se escinde en el sitio de acción (por ejemplo, por inflamación o proteasas específicas del cáncer) liberando la actividad completa de interleucina en el sitio deseado. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento y/o retención se une a la interleucina mediante un enlazador que no se escinde en el sitio de acción (por ejemplo, por inflamación o proteasas específicas del cáncer), lo que hace que la citocina permanezca en el sitio deseado.

Los antígenos de preferencia, en algunos casos, se expresan en la superficie de una célula o tejido enfermo, por ejemplo, un tumor o una célula cancerosa. Los antígenos útiles para el direccionamiento y retención de tumores incluyen, pero no se limitan a, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, c-Met, FOLR1 y CEA. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente también incluyen proteínas que comprenden dos dominios de direccionamiento y/o retención que se unen a dos antígenos diana diferentes que se sabe que se expresan en una célula o tejido enfermo. Los pares ejemplares de dominios de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, EGFR/CEA, EpCAM/CEA y HER-2/HER-3.

Los dominios de direccionamiento y/o retención adecuados incluyen dominios de unión al antígeno, como anticuerpos y fragmentos de los mismos, que incluyen un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de nanocuerpo de tipo camélido (VHH), un dAb y similares. Otros dominios de unión a antígenos adecuados incluyen proteínas que no son inmunoglobulinas que imitan la unión y/o estructura de anticuerpos tales como anticalinas, afiliaciones, moléculas afines, afímeros, affitinas, alfacuerpos, avímeros, DARPinas, finómeros, péptidos de dominio kunitz, monocuerpos y dominios de unión basado en otros andamios preparados por ingeniería como los andamios SpA, GroEL, fibronectina, lipocalina y CTLA4. Otros ejemplos de polipéptidos que se unen a antígenos incluyen un ligando para un receptor deseado, una parte de un receptor que se une al ligando, una lectina y péptidos que se unen o se asocian con uno o más antígenos diana.

En algunas realizaciones, los dominios de direccionamiento y/o retención se unen específicamente a una molécula de la superficie celular. En algunas realizaciones, los dominios de direccionamiento y/o retención se unen específicamente a un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos se unen específica e independientemente a un antígeno tumoral seleccionado de al menos una proteína de activación de fibroblastos alfa (FAPa), glucoproteína trofoblasto (5T4), transductor de señal de calcio asociado a tumor 2 (Trop2), fibronectina EDB (EDB -FN), dominio EIIIB de fibronectina, CGS-2, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA y FOLR1. En algunas realizaciones, los polipéptidos dirigidos se unen específica e independientemente a dos antígenos diferentes, en donde al menos uno de los antígenos es un antígeno tumoral seleccionado de proteína alfa de activación de fibroblastos (FAPa), glicoproteína de trofoblasto (5T4), transductor de señal de calcio asociado al tumor 2 (Trop 2), Fibronectina EDB (EDB-FN), dominio EIIIB de fibronectina, CGS-2, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA y FOLR1.

El antígeno de direccionamiento y/o retención puede ser un antígeno tumoral expresado en una célula tumoral. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, c-Met, FOLR1, PSMA, CD38, BCMA, and CEA. 5T4, AFP, B7-H3, Cadherina-6, CAIX, CD117, CD123, CD138, CD166, CD19, CD20, CD205, CD22, CD30, CD33, CD352, CD37, CD44, CD52, CD56, CD70, CD71, CD74, CD79b, DLL3, EphA2, FAP, FGFR2, FGFR3, GPC3, gpA33, FLT-3, gpNMB, HPV-16 E6, HPV-16 E7, ITGA2, ITGA3, SLC39A6, MAGE, mesotelina, Muc1, Muc16, NaPi2b, Nectin-4, P-cadherina, NY-ESO-1, PRLR, PSCA, PTK7, ROR1, SLC44A4, SLTRK5, SLTRK6, STEAP1, TIM1, Trop2, WT1.

El antígeno de direccionamiento y/o retención puede ser una proteína de punto de control inmunitario. Los ejemplos de proteínas de puntos de control inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, CD27, CD137, 2B4, TIGIT, CD155, ICOS, HVEM, CD40L, LIGHT, TIM-1, OX40, DNAM-1, PD-L1, PD1, PD-L2, CTLA-4, CD8, CD40, CEACAM1, CD48, CD70, A2AR, CD39, CD73, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO1, IDO2, TDO, KIR, LAG-3, TIM-3, o VISTA.

El antígeno de direccionamiento y/o retención puede ser una molécula de la superficie celular, como una proteína, un lípido o un polisacárido. En algunas realizaciones, un antígeno de direccionamiento y/o retención es una célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula infectada por bacterias, un glóbulo rojo dañado, una célula de placa arterial, una célula de tejido inflamado o fibrótico. El antígeno de direccionamiento y/o retención puede comprender un modulador de la respuesta inmune. Ejemplos de modulador de la respuesta inmune incluyen, entre otros, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), GITRL, CD3 o GITR.

El antígeno de direccionamiento y/o retención puede ser un receptor de citocina. Los ejemplos de receptores de citocinas incluyen, pero no se limitan a, receptores de citocinas de tipo I, tales como receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptores de IL de tipo I, receptor de Epo, receptor de LIF, receptor de CNTF, receptor de TPO; receptores de citocinas de tipo II, tales como receptor de IFN-alfa (IFNAR1, IFNAR2), receptor de IFB-beta, receptor de IFN-gamma (IFNGR1, IFNGR2), receptores de IL de tipo II; receptores de quimiocinas, tales como receptores de quimiocinas CC, receptores de quimiocinas CXC, receptores de quimiocinas CX3C, receptores de quimiocinas XC; receptores de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral, tales como TNFRSF5/CD40, TNFRSF8/CD30, TNFRSF7/CD27, TNFRSF1A/TNFR1/CD120a,

TNFRSF1B/TNFR2/CD120b; receptores de TGF-beta, tales como receptor 1 de TGF-beta, receptor 2 de TGF-beta; receptores de la superfamilia de Ig, como los receptores de IL-1, CSF-1R, PDGFR (PDGFRA, PDGFRB), SCFR.

5 Enlazadores

Como se indicó anteriormente, las composiciones farmacéuticas comprenden una o más secuencias enlazadoras. Una secuencia enlazadora sirve para proporcionar flexibilidad entre polipéptidos, de manera que, por ejemplo, el resto de bloqueo es capaz de inhibir la actividad del polipéptido de citocina. La secuencia enlazadora se puede ubicar entre cualquiera o todo el polipéptido de citocina, el elemento de extensión de la semivida sérica y/o el resto de bloqueo. Como se describe en la presente, al menos uno de los enlazadores es escindible por proteasa y contiene un (uno o más) sitios de escisión para una (o más) proteasa deseada. Preferiblemente, la proteasa deseada se enriquece o se expresa selectivamente en el sitio deseado de actividad de citocina (por ejemplo, el microambiente tumoral). Por tanto, la proteína de fusión se escinde preferencial o selectivamente en el sitio de la actividad de citocina deseada. Los polipéptidos de fusión que no comprenden un enlazador peptídico escindible por proteasa y un enlazador adicional que es opcionalmente escindible por proteasa, en donde para cada uno, independientemente, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en una calicreína, trombina, quimasa, carboxipeptidasa A, catepsina G, una elastasa, PR-3, granzima M, una calpaína, una metaloproteínasa de matriz (MMP), un activador de plasminógeno, una catepsina, una caspasa, una triptasa, o una proteasa de la superficie de células tumorales, no están englobados por la expresión de las reivindicaciones, aunque se consideran útiles para la comprensión de la invención.

Los enlazadores adecuados pueden ser de diferentes longitudes, como de 1 aminoácido (p. ej., Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluidos 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 aminoácidos.

La orientación de los componentes de la composición farmacéutica es en gran medida una cuestión de elección de diseño y se reconoce que son posibles múltiples orientaciones y todas están destinadas a estar incluidas en esta descripción. Por ejemplo, un resto de bloqueo puede ubicarse en el extremo C o en el extremo N de un polipéptido de citocina.

Las proteasas que se sabe que están asociadas con células o tejidos enfermos incluyen, entre otras, serina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, treonina proteasas, proteasas de ácido glutámico, metaloproteasas, péptido liasas de asparagina, proteasas en suero, catepsinas, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina K, catepsina L, calicreínas, hK1, hK10, hK15, plasmina, collagenasa, collagenasa de tipo IV, estromelisina, factor Xa, proteasa similar a quimotripsina, proteasa similar a tripsina, proteasa similar a elastasa, proteasa similar a la subtilisina, actinidaína, bromelina, calpaína, caspasas, caspasa-3, Mirl-CP, papaína, proteasa de VIH-1, proteasa de HSV, proteasa de CMV, quimosina, renina, pepsina, matriptasa, legumaína, plasmepsina, nepenténina, metaloexopeptidasas, metaloendopendoposa, metaloproteasas de matriz (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP11, MMP14, activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), enteroquinasa, antígeno prostático específico (PSA, hK3), enzima convertidora de interleucina-1 β , trombina, FAP (FAP-a), dipeptidil peptidasa, meprinas, granzimas y dipeptidil peptidasa IV (DPPIV/CD26). Las proteasas capaces de escindir secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico quiméricas proporcionadas en la presente pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en un antígeno prostático específico (PSA), una metaloproteínasa de matriz (MMP), una desintegrina A y una metaloproteínasa (ADAM), un activador del plasminógeno, una catepsina, una caspasa, una proteasa de la superficie de la célula tumoral y una elastasa. La MMP puede ser, por ejemplo, metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2) o metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9).

Las proteasas útiles en los métodos descritos en la presente se presentan en la Tabla 1, y las proteasas ejemplares y su sitio de escisión se presentan en la Tabla 1a:

Tabla 1. Proteasas relevantes para la inflamación y el cáncer

Proteasa	Especificidad	Otros aspectos
<i>Secretada por linfocitos T citotóxicos:</i>		
Granzima B (grB)	Escinde después de los residuos de Asp (asp-ase)	Tipo de serina proteasa; fuertemente implicado en la inducción de apoptosis de células objetivo dependientes de perforina
Granzima A (grA)	similar a la tripsina, escinde después de residuos básicos	Tipo de serina proteasa;
Granzima H (grH)	Especificidad de sustrato	Tipo de serina proteasa;

Proteasa	Especificidad	Otros aspectos
	desconocida	<i>Otras granzimas también son secretadas por los linfocitos T citolíticos, pero no todas están presentes en los seres humanos.</i>
Caspasa-8	Escinde después de los residuos de Asp	Tipo de cisteína proteasa; desempeña un papel esencial en la expansión celular inducida por TCR, el papel molecular exacto no está claro
Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT1)	Escinde después de los residuos de arginina	Tipo de cisteína proteasa; probablemente actúa como andamio y como enzima proteolíticamente activa en la vía de señalización dependiente de CBM
Triptasa	Objetivos: angiotensina I, fibrinógeno, prouroquinasa, TGFβ; escinde preferentemente proteínas después de residuos de lisina o arginina	Tipo de serina proteasa específica de mastocitos; similar a la tripsina; resistente a la inhibición por inhibidores de proteasas macromoleculares expresados en mamíferos debido a su estructura tetramérica, con todos los sitios enfrentados por un poro central estrecho; <i>también asociado con la inflamación</i>
Asociado con inflamación:		
Trombina	Objetivos: FGF-2, HB-EGF, osteopontina, PDGF, VEGF	Tipo de serina proteasa; modula la actividad de factores de crecimiento vascular, quimiocinas y proteínas extracelulares; refuerza la proliferación inducida por VEGF; induce la migración celular; factor angiogénico; regula la hemostasia
Quimasa	Exhibe una especificidad similar a la de la quimotripsina, escindiendo proteínas después de residuos de aminoácidos aromáticos	Tipo de serina proteasa específica de mastocitos
Carboxipeptidasa A (MC-CPA)	Escinde los residuos de aminoácidos del extremo C de péptidos y proteínas	Tipo de metaloproteinasa dependiente de zinc
Calicreínas	Objetivos: quininógeno de alto peso molecular, prouroquinasa	Tipo de serina proteasa; modular la respuesta de relajación; contribuir a la respuesta inflamatoria; degradación de fibrina
Elastasa	Objetivos: E-cadherina, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-6, IL8, p38 ^{MAPK} , TNFα, VE-cadherina	Tipo de serina proteasa de neutrófilos; degrada los componentes del ECM; regula la respuesta inflamatoria; activa la señalización proapoptótica
Catepsina G	Objetivos: EGF, ENA-78, IL-8, MCP-1, MMP-2, MT1-MMP, PAI-1, RANTES, TGFβ, TNFα	Tipo de serina proteasa; degrada los componentes del ECM; quimioatrayente de leucocitos; regula la respuesta inflamatoria; promueve la apoptosis
PR-3	Objetivos: ENA-78, IL-8, IL-18, JNK, p38 ^{MAPK} , TNFα	Tipo de serina proteasa; promueve la respuesta inflamatoria; activa la señalización proapoptótica
Granzima M (grM)	Escinde después de Met y otros residuos hidrófobos largos no ramificados	Tipo de serina proteasa; solo expresado en linfocitos NK
Calpaínas	Escinden entre Arg y Gly	Familia de cisteína proteasas; dependiente del calcio; la activación está involucrada en el proceso de numerosas enfermedades asociadas a la inflamación.

Tabla 1a: Proteasas Ejemplares y Secuencias de Reconocimiento de Proteasas

Proteasa	Secuencia de dominio de escisión	SEQ ID NO:
MMP7	KRALGLPG	3
MMP7	(DE)₈RPLALWRS(DR)₈	4
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	5

Proteasa	Secuencia de dominio de escisión	SEQ ID NO:
MMP9	LEATA	6
MMP11	GGAANLVRGG	7
MMP14	SGRIGFLRTA	8
MMP	PLGLAG	9
MMP	PLGLAX	10
MMP	PLGC(me)AG	11
MMP	ESPAYYTA	12
MMP	RLQLKL	13
MMP	RLQLKAC	14
MMP2, MMP9, MMP14	EP(Cit)G(Hof)YL	15
Activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA)	SGRSA	16
Activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA)	DAFK	17
Activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA)	GGGRR	18
Enzima lisosomal	GFLG	19
Enzima lisosomal	ALAL	20
Enzima lisosomal	FK	21
Catepsina B	NLL	22
Catepsina D	PIC(Et)FF	23
Catepsina K	GGPRGLPG	24
Antígeno específico de la próstata	HSSKLQ	25
Antígeno específico de la próstata	HSSKLQL	26
Antígeno específico de la próstata	HSSKLQEDA	27
Proteasa del virus del herpes simple	LVLASSSFGY	28
Proteasa del VIH	GVSQNYPIVG	29
Proteasa de CMV	GVVQASCRLA	30
Trombina	F(Pip)RS	31
Trombina	DPRSFL	32
Trombina	PPRSFL	33
Caspasa-3	DEVD	34
Caspasa-3	DEVDP	35
Caspasa-3	KGSGDVEG	36
Enzima convertidora de interleucina 1β	GWEHDG	37
Enteroquinasa	EDDDDKA	38
FAP	KQEQNPGST	39
Calicreína 2	GKAFFR	40
Plasmina	DAFK	41
Plasmina	DVLK	42
Plasmina	DAFK	43
TOP	ALLLALL	44

En la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden secuencias de polipéptidos. Al igual que con todos los péptidos, polipéptidos y proteínas, incluidos sus fragmentos, se entiende que pueden producirse modificaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos quiméricos (variantes de la secuencia de aminoácidos) que no alteren la naturaleza o función de los péptidos, polipéptidos o proteínas. Tales modificaciones incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas y se analizan con mayor detalle a continuación.

5

Las composiciones proporcionadas en la presente tienen una función deseada. Las composiciones están compuestas por al menos un polipéptido de IL-2, un resto de bloqueo, por ejemplo, un polipéptido de bloqueo estérico y un elemento de extensión de la semivida sérica opcional, y un polipéptido dirigido opcional, con uno o más enlazadores que conectan cada polipéptido en la composición. El primer polipéptido, por ejemplo, una muteína de IL-2, se proporciona como un agente activo. El resto de bloqueo se proporciona para bloquear la actividad de la interleucina. El polipéptido enlazador, por ejemplo, un polipéptido escindible por proteasa, se proporciona para ser escindido por una proteasa que se expresa específicamente en el objetivo pretendido del agente activo. Opcionalmente, el resto de bloqueo bloquea la actividad del primer polipéptido uniendo el

10

15

polipéptido de interleucina. En algunos casos, el resto de bloqueo, por ejemplo, un péptido de bloqueo estérico, se une a la interleucina mediante un enlazador escindible por proteasa que se escinde en el sitio de acción (por ejemplo, mediante proteasas específicas de inflamación o de tumores) liberando la actividad completa de la citocina en el sitio deseado.

5

El sitio de escisión de proteasa puede ser un sitio de escisión de proteasa de origen natural o un sitio de escisión de proteasa preparado por ingeniería artificialmente. El sitio de escisión de proteasa preparado por ingeniería artificialmente puede escindirse mediante más de una proteasa específica del entorno deseado en el que se producirá la escisión, por ejemplo, un tumor. El sitio de escisión de proteasa puede ser escindido por al menos una proteasa, al menos dos proteasas, al menos tres proteasas o al menos cuatro proteasas.

10

En algunas realizaciones, el enlazador comprende glicina-glicina, un motivo de reconocimiento de sortasa o un motivo de reconocimiento de sortasa y una secuencia peptídica $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 126) o $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 127), en donde n es 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, el motivo de reconocimiento de la sortasa comprende una secuencia peptídica LPXTG (SEQ ID NO: 125), donde X es cualquier aminoácido. En un caso, el enlace covalente es entre un residuo de lisina reactivo unido al extremo C del polipéptido de citocina y un ácido aspártico reactivo unido al extremo N del bloqueo u otro resto. En un caso, el enlace covalente es entre un residuo de ácido aspártico reactivo unido al extremo N del polipéptido de citocina y un residuo de lisina reactivo unido al extremo C del bloqueo u otro resto.

20

Escisión e inducibilidad

Como se describe en la presente, la actividad del polipéptido de citocina en el contexto de la proteína de fusión se atenúa y la escisión de la proteasa en el sitio de actividad deseado, como en un microambiente tumoral, libera una forma de la citocina de la proteína de fusión que es mucho más activa como agonista del receptor de citocina que la proteína de fusión. Por ejemplo, la actividad de activación (agonista) del receptor de citocina del polipéptido de fusión puede ser al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces menor que la actividad activadora del receptor de citocina del polipéptido de citocina como una entidad molecular separada. El polipéptido de citocina que forma parte de la proteína de fusión existe como una entidad molecular separada cuando contiene un aminoácido que es sustancialmente idéntico al polipéptido de citocina y no incluye sustancialmente aminoácidos adicionales y no está asociado (por enlaces covalentes o no covalentes) con otras moléculas. Si es necesario, un polipéptido de citocina como una entidad molecular separada puede incluir algunas secuencias de aminoácidos adicionales, tales como una etiqueta o secuencia corta para ayudar en la expresión y/o purificación. En los polipéptidos de fusión de la invención, la actividad de activación del receptor de IL-2 está atenuada. Las realizaciones en las que la actividad de activación del receptor de IL-2 del polipéptido de fusión no es al menos aproximadamente 10 veces menor que la actividad de activación del receptor de IL-2 del polipéptido que contiene el polipéptido de IL-2 que se produce por la escisión del o de los enlazadores escindibles por proteasa no están englobados en la expresión de las reivindicaciones, aunque se consideran útiles para la comprensión de la invención.

25

30

35

40

En otros ejemplos, la actividad de activación (agonista) del receptor de citocina del polipéptido de fusión es al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o aproximadamente 1000 veces menor que la actividad de activación del receptor de citocina del polipéptido que contiene el polipéptido de citocina que se produce por escisión del enlazador escindible por proteasa en la proteína de fusión. En otras palabras, la actividad de activación (agonista) del receptor de citocina del polipéptido que contiene el polipéptido de citocina que se produce por escisión del enlazador escindible por proteasa en la proteína de fusión es al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces mayor que la actividad de activación del receptor de citocina de la proteína de fusión.

45

50

55

Sustituciones en polipéptidos

Los polipéptidos descritos en la presente pueden incluir componentes (p. ej., la citocina, el resto de bloqueo) que tienen la misma secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína de origen natural (p. ej., IL-2, IL-15, HSA) o pueden tener una secuencia de aminoácidos que difiere de la proteína de origen natural siempre que se mantenga la función deseada. Se entiende que una forma de definir las modificaciones y derivados conocidos o aquellos que puedan surgir de las proteínas y ácidos nucleicos descritos que las codifican es definiendo las variantes de secuencia en términos de identidad con secuencias de referencia conocidas específicas. Se describen específicamente polipéptidos y ácidos nucleicos que tienen al menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento de identidad con los polipéptidos quiméricos proporcionados en la presente. Por ejemplo, se proporcionan polipéptidos o ácidos nucleicos que tienen al menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84,

60

65

85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento de identidad con la secuencia de cualquiera de los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en la presente. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente cómo determinar la identidad de dos polipéptidos o dos ácidos nucleicos. Por ejemplo, la identidad se puede calcular después de alinear las dos secuencias de modo que la identidad esté en su nivel más alto.

5

Otra forma de calcular la identidad se puede realizar mediante algoritmos publicados. La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante inspección.

10

Pueden obtenerse los mismos tipos de identidad para los ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos descritos en Zuker, Science 244: 48-52 (1989); Jaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706 - 7710 (1989); Jaeger et al., Methods Enzymol. 183: 281-306 (1989). Se entiende que se puede usar cualquiera de los métodos típicamente y que en ciertos casos los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto en la técnica comprende que, si se encuentra identidad con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la identidad declarada, y se describirá en la presente.

15

20

Las modificaciones de proteínas incluyen modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Las modificaciones en la secuencia de aminoácidos pueden surgir de forma natural como variaciones alélicas (p. ej., debido a polimorfismo genético), pueden surgir debido a la influencia ambiental (p. ej., por exposición a la luz ultravioleta), o pueden producirse por intervención humana (p. ej., por mutagénesis de secuencias de ADN clonadas), como mutantes puntuales, de delección, de inserción y de sustitución inducidos. Estas modificaciones pueden producir cambios en la secuencia de aminoácidos, proporcionar mutaciones silenciosas, modificar un sitio de restricción o proporcionar otras mutaciones específicas. Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos caen típicamente en una o más de tres clases: modificaciones de sustitución, inserción o delección. Las inserciones incluyen fusiones de extremo amino y/o carboxilo, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Normalmente, las inserciones serán inserciones más pequeñas que las de las fusiones de extremo amino o carboxilo, por ejemplo, del orden de uno a cuatro residuos. Las delecciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de proteínas. Normalmente, no se eliminan más de aproximadamente 2 a 6 residuos en cualquier sitio dentro de la molécula de proteína. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden ocurrir en varios lugares diferentes a la vez; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácidos; y las delecciones variarán de aproximadamente 1 a 30 residuos. Las delecciones o inserciones se realizan preferiblemente en pares adyacentes, es decir, una delección de 2 residuos o una inserción de 2 residuos. Las sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a una construcción final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Las modificaciones sustitutivas son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Generalmente, tales sustituciones se realizan de acuerdo con la siguiente Tabla 2 y se denominan sustituciones conservadoras.

25

30

35

40

45

Tabla 2. Sustituciones ejemplares de aminoácidos

Aminoácido	Sustituciones Ejemplares
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, Met, Ile
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val, Met
Leu	Ile, Val, Met

Aminoácido	Sustituciones Ejemplares
Lys	Arg, Gln, Met, Ile
Met	Leu, Ile, Val
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Met, Cys
Thr	Ser, Met, Val
Tip	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met

Las modificaciones, incluidas las sustituciones de aminoácidos específicas, se realizan mediante métodos conocidos. Por ejemplo, las modificaciones se realizan mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica el polipéptido, produciendo así el ADN que codifica la modificación, y luego expresando el ADN en cultivo de células recombinantes. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis por PCR.

Se pueden seleccionar modificaciones para optimizar la unión. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de maduración por afinidad para alterar la unión del scFv mediante la introducción de mutaciones aleatorias dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Tales mutaciones aleatorias se pueden introducir usando una variedad de técnicas, que incluyen radiación, mutágenos químicos o PCR propensa a errores. Se pueden realizar múltiples rondas de mutación y selección usando, por ejemplo, presentación en fagos.

La descripción también se refiere a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos quiméricos descritos en la presente, y al uso de dichos ácidos nucleicos para producir los polipéptidos quiméricos y con fines terapéuticos. Por ejemplo, la invención incluye moléculas de ADN y ARN (por ejemplo, ARNm, ARN autorreplicante) que codifican un polipéptido quimérico y para el uso terapéutico de dichas moléculas de ADN y ARN.

20 **Composiciones ejemplares**

Las proteínas de fusión ejemplares de la invención combinan los elementos descritos anteriormente en una variedad de orientaciones como se define en las reivindicaciones. Las orientaciones descritas en esta sección son ejemplos y no deben considerarse limitantes.

En la presente invención, la proteína de fusión comprende un polipéptido de IL-2, un resto de bloqueo y un elemento de extensión de la semivida. En algunos casos, no reivindicados específicamente como tales, el polipéptido de IL-2 está posicionado entre el elemento de extensión de la semivida y el resto de bloqueo. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-2 es de extremo N al resto de bloqueo y al elemento de extensión de la semivida. En algunas de tales realizaciones, el polipéptido de IL-2 está cerca del resto de bloqueo; en algunas de tales realizaciones, el polipéptido de IL-2 está cerca del elemento de extensión de la semivida. En todas las realizaciones debe incluirse al menos un enlazador escindible por proteasa, de modo que el polipéptido de IL-2 pueda ser activo tras la escisión. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-2 es de extremo C para el resto de bloqueo y el elemento de extensión de la semivida. Los elementos adicionales se pueden unir entre sí mediante un enlazador escindible, un enlazador no escindible o mediante fusión directa. En algunos casos, es beneficioso incluir dos citocinas iguales para facilitar la dimerización.

En algunas realizaciones, los dominios de bloqueo usados son capaces de extender la semivida y el polipéptido de IL-2 se posiciona entre dos de dichos dominios de bloqueo. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-2 se posiciona entre dos dominios de bloqueo, uno de los cuales es capaz de extender la semivida.

En algunas realizaciones, se incluyen dos citocinas en la misma construcción donde al menos una es IL-2. En algunas realizaciones, las citocinas están conectadas a dos dominios de bloqueo cada una (tres en total en una molécula), con un dominio de bloqueo entre los dos dominios de citocinas. En algunas realizaciones, pueden incluirse uno o más dominios de extensión de la semivida adicionales para optimizar las propiedades farmacocinéticas.

En algunas realizaciones, se incluyen tres citocinas en la misma construcción. En algunas realizaciones, la tercera citocina puede funcionar para bloquear las otras dos en lugar de un dominio de bloqueo entre las dos citocinas.

Los elementos de extensión de la semivida preferidos para usar en las proteínas de fusión son la albúmina sérica humana (HSA), un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFV, dAb) que se une a la albúmina sérica, una IgG humana o humanizada, o un fragmento de cualquiera de los anteriores. En algunos casos preferidos, el resto de bloqueo es albúmina sérica humana (HSA), o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a albúmina sérica, un anticuerpo que se une a la citocina y previene la activación de la unión o activación del receptor de citocina, otra citocina o un fragmento de cualquiera de los anteriores. En realizaciones preferidas que comprenden un dominio de direccionamiento adicional, el dominio de direccionamiento es un anticuerpo que se une a una proteína de la superficie celular que está enriquecida en la superficie de las células cancerosas, como EpCAM, FOLR1 y Fibronectina.

Métodos de tratamiento y composiciones farmacéuticas

Se proporcionan además métodos para tratar a un sujeto con o en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno, como una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria, un trastorno inmunológico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa, una enfermedad viral, una reacción alérgica, una reacción parasitaria o una enfermedad de injerto contra huésped. Los métodos para administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una proteína de fusión como se describe en la presente que se administra típicamente como una composición farmacéutica. En algunos casos, el método comprende además seleccionar un sujeto con o en riesgo de desarrollar tal enfermedad o trastorno. La composición farmacéutica comprende preferiblemente una citocina bloqueada, fragmento o muteína de la misma que se activa en un sitio de inflamación o un tumor. En un caso, el polipéptido quimérico comprende un polipéptido de citocina, fragmento o muteína del mismo y un elemento de extensión de la semivida sérica. En otro caso, el polipéptido quimérico comprende un polipéptido de citocina, fragmento o muteína del mismo y un resto de bloqueo, por ejemplo, un polipéptido de bloqueo estérico, en donde el polipéptido de bloqueo estérico es capaz de bloquear estéricamente la actividad del polipéptido de citocina, fragmento o muteína del mismo. En otro caso, el polipéptido quimérico comprende un polipéptido de citocina, fragmento o muteína del mismo, un resto de bloqueo y un elemento de extensión de la semivida sérica.

La inflamación es parte de la compleja respuesta biológica de los tejidos corporales a estímulos dañinos, como patógenos, células dañadas o irritantes, y es una respuesta protectora que involucra células inmunes, vasos sanguíneos y mediadores moleculares. La función de la inflamación es eliminar la causa inicial de la lesión celular, limpiar las células necróticas y los tejidos dañados por la agresión original y el proceso inflamatorio, e iniciar la reparación del tejido. La inflamación puede producirse por infección, como un síntoma o una enfermedad, por ejemplo, cáncer, aterosclerosis, alergias, miopatías, VIH, obesidad o una enfermedad autoinmune. Una enfermedad autoinmune es una condición crónica que surge de una respuesta inmune anormal a un autoantígeno. Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con los polipéptidos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, lupus, enfermedad celíaca, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

La composición farmacéutica puede comprender una o más secuencias enlazadoras escindibles por proteasa. La secuencia enlazadora sirve para proporcionar flexibilidad entre polipéptidos, de modo que cada polipéptido sea capaz de inhibir la actividad del primer polipéptido. La secuencia enlazadora se puede ubicar entre cualquiera o todo el polipéptido de citocina, fragmento o muteína del mismo, el resto de bloqueo y el elemento de extensión de la semivida sérica. Opcionalmente, la composición comprende dos, tres, cuatro o cinco secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora, dos, tres o cuatro secuencias enlazadoras pueden ser secuencias enlazadoras iguales o diferentes. En una realización, la secuencia enlazadora comprende GGGGS (SEQ ID NO: 132), GSGSGS (SEQ ID NO: 133) o G(SGGG)₂SGGT (SEQ ID NO: 134). En otra realización, el enlazador comprende una secuencia escindible por proteasa seleccionada del grupo que consiste en HSSKLQ (SEQ ID NO: 25), GPLGVRG (SEQ ID NO: 128), IPVSLRSG (SEQ ID NO: 129), VPLSLYSG (SEQ ID NO: 130) y SGESPAYTA (SEQ ID NO: 131).

En la invención, al menos un enlazador es escindido por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en una calicreína, trombina, quimasa, carboxipeptidasa A, cathepsina G, una elastasa, PR-3, granzima M, una calpaína, una metaloproteínasa de matriz (MMP), un activador del plasminógeno, una cathepsina, una caspasa, una triptasa o una proteasa de la superficie de la célula tumoral.

Los enlazadores adecuados pueden ser de diferentes longitudes, como de 1 aminoácido (p. ej., Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluidos 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 aminoácidos.

Se proporcionan además métodos para tratar a un sujeto con o en riesgo de desarrollar cáncer. Los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido quimérico (una proteína

de fusión) como se describe en la presente que se administra típicamente como una composición farmacéutica. En algunos casos, el método comprende además seleccionar un sujeto con o en riesgo de desarrollar cáncer. La composición farmacéutica comprende preferiblemente una citocina bloqueada, fragmento o muteína de la misma que se activa en el sitio del tumor. Preferiblemente, el tumor es un tumor sólido. El cáncer puede ser, pero no se limita, un cáncer de colon, un cáncer de pulmón, un melanoma, un sarcoma, un carcinoma de células renales y un cáncer de mama.

El método puede implicar además la administración de uno o más agentes adicionales para tratar el cáncer, tales como agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, Adriamicina, Cerubidina, Bleomicina, Alkeran, Velban, Oncovina, Fluorouracilo, Tiotepa, Metotrexato, Bisantreno, Noantrona, Tiguanina, Citaribina, Procarabizina), agentes inmuno-oncológicos (p. ej., anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-CD47, anti-GD2), terapias celulares (p. ej., CAR-T, terapia de linfocitos T), virus oncolíticos y similares.

En la presente se proporcionan formulaciones o composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos quiméricos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones proporcionadas en la presente son adecuadas para la administración *in vitro* o *in vivo*. Por vehículo farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material se administra a un sujeto sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con los otros componentes de la formulación o composición farmacéutica en la que se encuentra contenido. El vehículo se selecciona para minimizar la degradación del ingrediente activo y minimizar los efectos secundarios adversos en el sujeto.

Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Normalmente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica, aunque la formulación puede ser hipertónica o hipotónica si se desea. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, soluciones tamponadas como la solución de Ringer y la solución de dextrosa. El pH de la solución es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 7 a 7.5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los polipéptidos inmunogénicos. Las matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración de la composición que se administra. Los vehículos son aquellos adecuados para la administración de polipéptidos quiméricos o secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos quiméricos a seres humanos u otros sujetos.

Las formulaciones o composiciones farmacéuticas se administran de varias formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. Las composiciones se administran mediante cualquiera de varias vías de administración, que incluyen tópica, oral, parenteral, intravenosa, intraarticular, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, transdérmica, intrahepática, intracraneal, nebulización/inhalación o por instalación mediante broncoscopia. En algunas realizaciones, las composiciones se administran localmente (no sistémicamente), incluyendo intratumoralmente, intraarticularmente, intratecalmente, etc.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. Opcionalmente se encuentran presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Las formulaciones para administración tópica incluyen pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares son opcionalmente necesarios o deseables.

Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensión o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, saquitos o tabletas. Opcionalmente son deseables espesantes, saborizantes, diluyentes, emulsionantes, coadyuvantes de dispersión o aglutinantes.

Opcionalmente, los polipéptidos quiméricos o las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos quiméricos se administran mediante un vector. Hay una serie de composiciones y métodos que se pueden usar para administrar moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos a las células, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, mediante vectores de expresión. Estos métodos y composiciones se pueden dividir en gran medida en dos clases: sistemas de administración basados en virus y sistemas de administración no basados en virus. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y fácilmente adaptables para su uso con las composiciones y

métodos descritos en la presente. Tales composiciones y métodos pueden usarse para transfectar o transducir células in vitro o in vivo, por ejemplo, para producir líneas celulares que expresan y preferiblemente secretan el polipéptido quimérico codificado o para administrar de forma terapéutica ácidos nucleicos a un sujeto. Los componentes de los ácidos nucleicos quiméricos descritos en la presente típicamente están enlazados operativamente en marco para codificar una proteína de fusión.

Como se usa en la presente, los vectores plasmídicos o virales son agentes que transportan los ácidos nucleicos descritos al interior de la célula sin degradación e incluyen un promotor que produce la expresión de la molécula de ácido nucleico y/o polipéptido en las células en las que se administra. Los vectores virales son, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, virus vaccinia, virus de la polio, Sindbis y otros virus de ARN, incluidos estos virus con la cadena principal del VIH. También se prefieren las familias virales que comparten las propiedades de estos virus que los hacen adecuados para su uso como vectores. Los vectores retrovirales, en general, están descritos por Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997). Se ha descrito la construcción de adenovirus de replicación defectuosa (Berkner et al., *J. Virol.* 61: 1213-20 (1987); Massie et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:2872-83 (1986); Haj-Ahmad et al., *J. Virol.* 57:267-74 (1986); Davidson et al., *J. Virol.* 61:1226-39 (1987); Zhang et al., *BioTechniques* 15:868-72 (1993)). El beneficio y el uso de estos virus como vectores es que están limitados en la medida en que pueden propagarse a otros tipos de células, ya que pueden replicarse dentro de una célula infectada inicial, pero no pueden formar nuevas partículas virales infecciosas. Se ha demostrado que los adenovirus recombinantes logran una alta eficacia después de la administración directa in vivo al epitelio de las vías respiratorias, los hepatocitos, el endotelio vascular, el parénquima del SNC y varios otros sitios de tejido. Otros sistemas útiles incluyen, por ejemplo, vectores de virus vaccinia replicantes y no replicantes restringidos al huésped.

Los polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico proporcionados pueden administrarse mediante partículas similares a virus. Las partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) consisten en proteína/s viral/es derivada/s de las proteínas estructurales de un virus. Los métodos para fabricar y usar partículas similares a virus se describen en, por ejemplo, Garcea y Gissmann, *Current Opinion in Biotechnology* 15:513-7 (2004).

Los polipéptidos proporcionados pueden ser administrados por cuerpos densos (DB, por sus siglas en inglés) subvirales. Los DB transportan proteínas a las células objetivo mediante la fusión de membranas. Los métodos para fabricar y usar DB se describen, por ejemplo, en Pepperl-Klindworth et al., *Gene Therapy* 10: 278-84 (2003).

Los polipéptidos proporcionados pueden administrarse mediante agregados de tegumentos. Los métodos para fabricar y usar agregados de tegumentos se describen en la publicación internacional no. WO 2006/110728.

Los métodos de administración no basados en virus pueden incluir vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico y secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, en donde los ácidos nucleicos están operativamente unidos a una secuencia de control de la expresión. Las cadenas principales de vector adecuadas incluyen, por ejemplo, las que se utilizan habitualmente en la técnica tales como plásmidos, cromosomas artificiales, BAC, YAC o PAC. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles comercialmente de empresas tales como Novagen (Madison, Wis.), Clontech (Pal Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA) e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA). Los vectores contienen típicamente una o más regiones reguladoras. Las regiones reguladoras incluyen, sin limitación, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteínas, elementos inducibles, secuencias de unión a proteínas, regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', sitios de inicio de la transcripción, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación e intrones. Dichos vectores también se pueden usar para preparar polipéptidos quiméricos mediante la expresión en una célula huésped adecuada, como las células CHO.

Los promotores preferidos que controlan la transcripción de vectores en células huésped de mamíferos pueden obtenerse de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus como polioma, virus de simio 40 (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferiblemente, citomegalovirus (CMV), o de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de β -actina o el promotor EF1 α , o de promotores híbridos o quiméricos (por ejemplo, el promotor de CMV fusionado con el promotor de β -actina). Por supuesto, los promotores de la célula huésped o especies relacionadas también son útiles en la presente.

El potenciador generalmente se refiere a una secuencia de ADN que funciona a una distancia no fija del sitio de inicio de la transcripción y puede estar en 5' o 3' con respecto a la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón, así como dentro de la propia secuencia codificante. Suelen tener entre 10 y 300 pares de bases (pb) de longitud y funcionan en cis. Los potenciadores suelen funcionar para aumentar la transcripción de los promotores cercanos. Los potenciadores también pueden contener elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Aunque se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina), típicamente se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas para la expresión general. Los ejemplos preferidos son el potenciador de SV40 en la parte posterior del origen de replicación, el potenciador del promotor temprano

de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la parte posterior del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

- El promotor y/o el potenciador pueden ser inducibles (por ejemplo, regulados química o físicamente). Un promotor y/o potenciador químicamente regulado puede, por ejemplo, estar regulado por la presencia de alcohol, tetraciclina, un esteroide o un metal. Un promotor y/o potenciador físicamente regulado puede, por ejemplo, estar regulado por factores ambientales, tales como temperatura y luz. Opcionalmente, la región promotora y/o potenciadora puede actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción a transcribir. En ciertos vectores, la región promotora y/o potenciadora puede ser activa de una manera específica del tipo celular. Opcionalmente, en ciertos vectores, la región promotora y/o potenciadora puede ser activa en todas las células eucariotas, independientemente del tipo de célula. Los promotores preferidos de este tipo son el promotor CMV, el promotor SV40, el promotor β -actina, el promotor EF1 α y la repetición terminal larga retroviral (LTR, por sus siglas en inglés).
- Los vectores también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable, por ejemplo, resistencia a antibióticos, a una célula. El producto marcador se usa para determinar si el vector se ha administrado a la célula y una vez administrado se está expresando. Los ejemplos de marcadores seleccionables para células de mamíferos son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, higromicina, puromicina y blasticidina. Cuando dichos marcadores seleccionables se transfieren con éxito a una célula huésped de mamífero, la célula huésped de mamífero transformada puede sobrevivir si se coloca bajo presión selectiva. Los ejemplos de otros marcadores incluyen, por ejemplo, el gen lacZ de *E. coli*, la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y la luciferasa. Además, un vector de expresión puede incluir una secuencia etiqueta diseñada para facilitar la manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Las secuencias de etiquetas, tales como GFP, glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina o secuencias de etiquetas FLAG™ (Kodak; New Haven, Connecticut) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Dichas etiquetas se pueden insertar en cualquier lugar dentro del polipéptido, incluso en el extremo carboxilo o amino.
- Como se usa en la presente, el término péptido, polipéptido o proteína se usa ampliamente para significar dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La proteína, el péptido y el polipéptido también se usan en la presente indistintamente para referirse a secuencias de aminoácidos. Debe reconocerse que el término polipéptido no se usa en la presente para sugerir un tamaño o número particular de aminoácidos que comprenden la molécula y que un péptido de la invención puede contener hasta varios residuos de aminoácidos o más. Como se usa en toda la memoria, el sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, gato, perro, vaca, cerdo, oveja, cabra, ratón, conejo, rata y conejillo de indias), aves, reptiles, anfibios, peces y cualquier otro animal. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende cubrir a sujetos adultos y recién nacidos, ya sean machos o hembras. Como se usa en la presente, paciente o sujeto pueden usarse indistintamente y pueden referirse a un sujeto con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

- Un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno puede estar genéticamente predispuesto a la enfermedad o trastorno, por ejemplo, tener antecedentes familiares o tener una mutación en un gen que causa la enfermedad o trastorno, o mostrar signos o síntomas tempranos de la enfermedad o trastorno. Un sujeto que actualmente padece una enfermedad o trastorno tiene uno o más de un síntoma de la enfermedad o trastorno y puede haber sido diagnosticado con la enfermedad o trastorno.

- Los métodos y agentes descritos en la presente son útiles tanto para el tratamiento profiláctico como terapéutico. Para uso profiláctico, una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos quiméricos o secuencias de ácidos nucleicos quiméricos que codifican los polipéptidos quiméricos descritos en la presente se administra a un sujeto antes de la aparición (por ejemplo, antes de signos evidentes de cáncer o inflamación) o durante la aparición temprana (por ejemplo, con los signos y síntomas iniciales de cáncer o inflamación). La administración profiláctica puede ocurrir durante varios días o años antes de la manifestación de síntomas de cáncer o inflamación. La administración profiláctica puede usarse, por ejemplo, en el tratamiento preventivo de sujetos diagnosticados con una predisposición genética al cáncer. El tratamiento terapéutico implica administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos quiméricos o secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos quiméricos descritos en la presente después del diagnóstico o desarrollo de cáncer o inflamación (por ejemplo, una enfermedad autoinmune). El uso profiláctico también puede aplicarse cuando un paciente se somete a un tratamiento, por ejemplo, una quimioterapia, en la que se espera inflamación.

- Según los métodos indicados en la presente, al sujeto se le administra una cantidad eficaz del agente (por ejemplo, un polipéptido quimérico). Los términos cantidad eficaz y dosis eficaz se utilizan indistintamente. El término cantidad eficaz se define como cualquier cantidad necesaria para producir una respuesta fisiológica deseada. Las cantidades y cronogramas efectivos para administrar el agente pueden determinarse

empíricamente, y la realización de tales determinaciones está dentro de los conocimientos de la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración son los suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se ven afectados uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, reducidos o retrasados). La dosis no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos sustanciales, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. Generalmente, la dosis variará con la edad, condición, sexo, tipo de enfermedad, extensión de la enfermedad o trastorno, vía de administración o si se incluyen otros fármacos en el régimen, y puede ser determinada por un experto en la técnica. La dosis puede ser ajustada por el médico particular en caso de contraindicaciones. Las dosis pueden variar y pueden administrarse en una o más dosis diarias, durante uno o varios días. En la bibliografía se puede encontrar orientación sobre las dosis adecuadas para determinadas clases de productos farmacéuticos.

Como se usa en la presente, los términos tratamiento, tratar o tratando se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o afección o síntoma de la enfermedad o afección. Por lo tanto, en el método descrito, el tratamiento puede referirse a una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en la gravedad de una enfermedad o condición o síntoma de la enfermedad o afección establecida. Por ejemplo, un método para tratar una enfermedad se considera un tratamiento si hay una reducción del 10 % en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con un control. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier reducción porcentual entre el 10 % y el 100 % en comparación con niveles nativos o de control. Se entiende que el tratamiento no se refiere necesariamente a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección o síntomas de la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, los términos prevención, prevenir y previniendo una enfermedad o trastorno se refieren a una acción, por ejemplo, la administración del polipéptido quimérico o la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico, que ocurre antes o aproximadamente al mismo tiempo que un sujeto comienza a mostrar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, lo que inhibe o retrasa la aparición o exacerbación de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. Como se usa en la presente, las referencias a disminuir, reducir o inhibir incluyen un cambio del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en comparación con un nivel de control. Dichos términos pueden incluir, pero no necesariamente incluyen, la eliminación completa.

Se han desarrollado variantes de IL-2 que son selectivas para IL2R $\alpha\beta\gamma$ en relación con IL2R $\beta\gamma$ (Shanafelt, A.B., et al., 2000, Nat Biotechnol.18: 1197-202; Cassell, D.J., et. Al., 2002, Curr Pharm Des., 8:2171-83). Estas variantes tienen sustituciones de aminoácidos que reducen su afinidad por IL2R β . Debido a que la IL-2 tiene una afinidad indetectable por IL2R γ , estas variantes en consecuencia tienen una afinidad reducida por el complejo del receptor IL2R $\beta\gamma$ y una capacidad reducida para activar las células que expresan IL2R $\beta\gamma$, pero conservan la capacidad de unirse a IL2R α y la capacidad de unirse y activar el complejo del receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$.

Una de estas variantes, IL2/N88R (Bay 50-4798), fue probada clínicamente como una versión de baja toxicidad de IL-2 como estimulador del sistema inmunitario, basándose en la hipótesis de que las células NK que expresan IL2R $\beta\gamma$ son un importante contribuyente a la toxicidad. Se demostró que Bay 50-4798 estimula selectivamente la proliferación de linfocitos T activados en relación con los linfocitos NK, y se evaluó en ensayos clínicos de fase I/II en pacientes con cáncer (Margolin, K., et. Al., 2007, Clin Cancer Res., 13: 3312-9) y pacientes con VIH (Davey, R.T., et. Al., 2008, J Interferon Cytokine Res., 28:89-100). Estos ensayos clínicos mostraron que Bay 50-4798 era considerablemente más seguro y tolerable que la aldesleucina, y también mostraron que aumentaba los niveles de linfocitos T CD4+CD25+, una población de células enriquecida en linfocitos Treg. Posteriormente a estos ensayos, la investigación en el campo estableció más completamente la identidad de los linfocitos Treg y demostró que los linfocitos Treg expresan selectivamente IL2R $\alpha\beta\gamma$ (revisado en Malek, T.R., et al., 2010, Immunity, 33: 153-65).

Además, pueden prepararse mutantes que alteren selectivamente la afinidad por la cadena CD25 con respecto a la IL-2 nativa.

La IL-2 se puede preparar por ingeniería para producir mutantes que se unen al complejo IL-2R en general o la subunidad IL-2R α específicamente con una afinidad que difiere de la de la IL-2 de tipo salvaje correspondiente o de un mutante actualmente disponible (denominado C125S, ya que el residuo de cisteína en la posición 125 se reemplaza con un residuo de serina).

Por consiguiente, la presente invención presenta polipéptidos de interleucina-2 (IL-2*) mutantes que incluyen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la IL-2 de tipo salvaje (por ejemplo, 85, 87, 90, 95, 97, 98, o 99 % idéntica) y que se une, en comparación con IL-2 WT (tipo salvaje), con mayor al receptor trimérico de IL-2 en relación con el receptor de IL-2 dimérico. Normalmente, las muteínas también se unirán a una subunidad α del receptor de IL-2 (IL-2R α) con una afinidad que es mayor que la afinidad con la que la IL-2 de tipo salvaje se une a IL-2R α . La secuencia de aminoácidos dentro de los polipéptidos de IL-2 mutantes puede variar de SEQ ID NO: 1 (número de acceso de UniProtKB P60568) en virtud de que contiene (o solo contiene) una o más sustituciones de aminoácidos, que pueden considerarse sustituciones conservadoras o

no conservadoras. También se pueden incorporar aminoácidos de origen no natural. Alternativamente, o además, la secuencia de aminoácidos puede variar de la SEQ ID NO: 1 (que puede considerarse la secuencia de "referencia") en virtud de contener y añadir y/o eliminar uno o más residuos de aminoácidos. Más específicamente, la secuencia de aminoácidos puede diferir de la de SEQ ID NO: 1 en virtud de una mutación en al menos una de las siguientes posiciones de SEQ ID NO: 1: 1, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 26, 29, 30, 31, 35, 37, 46, 48, 49, 54, 61, 64, 67, 68, 69, 71, 73, 74, 75, 76, 79, 88, 89, 90, 92, 99, 101, 103, 114, 125, 128 o 133 (o combinaciones de las mismas). Como se señaló, se puede modificar tan solo una de estas posiciones, al igual que dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u 11 o más (incluso hasta todas) las posiciones. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede diferir de la SEQ ID NO: 1 en las posiciones 69 y 74 y además en una o más de las posiciones 30, 35 y 128. La secuencia de aminoácidos también puede diferir de la SEQ ID NO: 2 (como se describe en el documento US 7569215) en uno de los siguientes conjuntos de posiciones: (a) posiciones 64, 69 y 74; (b) posiciones 69, 74 y 101; (c) posiciones 69, 74 y 128; (d) posiciones 30, 69, 74 y 103; (e) posiciones 49, 69, 73 y 76; (f) posiciones 69, 74, 101 y 133; (g) posiciones 30, 69, 74 y 128; (h) posiciones 69, 74, 88 y 99; (i) posiciones 30, 69, 74 y 128; (j) posiciones 9, 11, 35, 69 y 74; (k) posiciones 1, 46, 49, 61, 69 y 79; (l) posiciones 48, 68, 71, 90, 103 y 114; (m) posiciones 4, 10, 11, 69, 74, 88 y 133; (n) posiciones 15, 30, 31, 35, 48, 69, 74 y 92; (o) posiciones 30, 68, 69, 71, 74, 75, 76 y 90; (p) posiciones 30, 31, 37, 69, 73, 74, 79 y 128; (q) posiciones 26, 29, 30, 54, 67, 69, 74 y 92; (r) posiciones 8, 13, 26, 30, 35, 37, 69, 74 y 92; y (s) posiciones 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 y 89. Aparte de las mutaciones en estas posiciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-2 mutante puede ser idéntica de otro modo a la SEQ ID NO: 1. Con respecto a las sustituciones específicas, la secuencia de aminoácidos puede diferir de la SEQ ID NO: 1 en virtud de tener una o más de las siguientes mutaciones: A1T, S4P, K8R, K9T, T10A, Q11R, Q13R, E15K, N26D, N29S, N30S, N30D, N30T, Y31H, Y31C, K35R, T37A, T37R, M46L, K48E, K49R, K49E, K54R, E61D, K64R, E67G, E68D, V69A, N71T, N71A, N71R, A73V, Q74P, S75P, K76E, K76R, H79R, N88D, I89V, N90H, I92T, S99P, T101A, F103S, I114V, I128T, I128A, T133A o T133N. Nuestra nomenclatura es consistente con la de la literatura científica, donde al código de una sola letra del aminoácido en la secuencia de referencia o de tipo salvaje le sigue su posición dentro de la secuencia y luego por el código de una sola letra del aminoácido con el que es remplazado. Por lo tanto, A1T designa una sustitución del residuo alanina en la posición 1 por treonina. Otros polipéptidos mutantes dentro del alcance de la invención incluyen aquellos que incluyen un mutante de SEQ ID NO: 2 que tiene sustituciones en V69 (por ejemplo, A) y Q74 (por ejemplo, P). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede incluir uno de los siguientes conjuntos de mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 2: (a) K64R, V69A y Q74P; (b) V69A, Q74P y T101A; (c) V69A, Q74P e I128T; (d) N30D, V69A, Q74P y F103S; (e) K49E, V69A, A73V y K76E; (f) V69A, Q74P, T101A y T133N; (g) N30S, V69A, Q74P e I128A; (h) V69A, Q74P, N88D y S99P; (i) N30S, V69A, Q74P e I128T; (j) K9T, Q11R, K35R, V69A y Q74P; (k) A1T, M46L, K49R, E61D, V69A y H79R; (l) K48E, E68D, N71T, N90H, F103S e I114V; (m) S4P, T10A, Q11R, V69A, Q74P, N88D y T133A; (n) E15K, N30S Y31H, K35R, K48E, V69A, Q74P e I92T; (o) N30S, E68D, V69A, N71A, Q74P, S75P, K76R y N90H; (p) N30S, Y31C, T37A, V69A, A73V, Q74P, H79R e I128T; (q) N26D, N29S, N30S, K54R, E67G, V69A, Q74P e I92T; (r) K8R, Q13R, N26D, N30T, K35R, T37R, V69A, Q74P e I92T; y (s) N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D e I89V. La SEQ ID NO: 2 se describe en el documento US 7569215, que es una secuencia polipeptídica de IL-2 ejemplar que se puede usar en la invención.

Como se indicó anteriormente, cualquiera de los polipéptidos de IL-2 mutantes descritos en la presente puede incluir las secuencias descritas; también pueden limitarse a las secuencias descritas y por lo demás idénticas a SEQ ID NO: 1. Además, cualquiera de los polipéptidos de IL-2 mutantes descritos en la presente puede incluir opcionalmente una sustitución del residuo de cisteína en la posición 125 por otro residuo (p. ej., serina) y/o puede incluir opcionalmente una delección del residuo de alanina en la posición 1 de SEQ ID. NO: 1.

Los polipéptidos de IL-2 mutantes descritos en la presente pueden unirse a la subunidad IL-2R α con una K_d de menos de aproximadamente 28 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 25 nM; menos de aproximadamente 5 nM; aproximadamente 1 nM; menos de aproximadamente 500 pM); o menos de aproximadamente 100 pM). Más específicamente, un polipéptido de IL-2 mutante puede tener una constante de equilibrio de afinidad menor que 1.0 nM (por ejemplo, aproximadamente 0.8, 0.6, 0.4 o 0.2 nM). La afinidad también se puede expresar como una tasa relativa de disociación de una subunidad de IL-2R α o de un complejo receptor de IL-2 (por ejemplo, un complejo expresado en la superficie de una célula o unido a la membrana de otro modo). Por ejemplo, los polipéptidos de IL-2 mutantes pueden disociarse de, por ejemplo, IL-2R α , a una velocidad reducida en relación con un polipéptido de tipo salvaje o con un agente terapéutico basado en IL-2, por ejemplo, IL-2*. Alternativamente, la afinidad se puede caracterizar como el tiempo, o el tiempo promedio, en el que persiste un polipéptido de IL-2*, por ejemplo, en la superficie de una célula que expresa IL-2R. Por ejemplo, un polipéptido de IL-2* puede persistir en el receptor durante al menos aproximadamente 2, 5, 10, 50, 100 o 250 veces (o más).

Se describen materiales, composiciones y componentes que pueden usarse, pueden usarse junto con, pueden usarse en la preparación o son productos de los métodos y composiciones descritos. Estos y otros materiales se describen en la presente, y se entiende que cuando se describen combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, si bien la referencia específica de cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos no se puede describir explícitamente, cada una se contempla y describe específicamente en la presente. Por ejemplo, si se describe

y analiza un método y se analizan una serie de modificaciones que se pueden realizar en varias moléculas, incluido el método, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del método, y las modificaciones que son posibles a menos que específicamente se indique lo contrario. Asimismo, cualquier subconjunto o combinación de estos también se contempla y describe específicamente.

Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta descripción, incluidos, entre otros, las etapas en los métodos que utilizan las composiciones descritas. Por lo tanto, si hay una variedad de etapas adicionales que se pueden realizar, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede realizar con cualquier etapa específica del método o combinación de etapas del método de los métodos descritos, y que cada una de dichas combinaciones o subconjuntos de combinaciones se contemplan específicamente y deben considerarse descritas.

Ejemplos

Lo siguiente incluye ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se debe entender que se pueden llevar a la práctica otras realizaciones conforme a las reivindicaciones, dada la descripción general proporcionada en la presente.

Ejemplo 1: Detección de IL-2, muteína de IL-2, IL-2R α e IL-2R γ en las proteínas de fusión por ELISA

La muteína de IL-2 se detecta con un anticuerpo disponible comercialmente, por ejemplo, el anti-IL-2 monoclonal (JES6-1A12) (BD Pharmingen; San José, CA). Se usa un control positivo para mostrar si el anticuerpo monoclonal reconoce la citocina o la muteína. También se utilizan anticuerpos contra la cadena IL-2R α e IL-2R γ . Los pocillos de una placa de 96 pocillos se recubren con un anticuerpo (2.5 μ g/ml) en PBS. Los pocillos se bloquean con leche desnatada al 5 % en PBS con 0.2 % de Tween[®]20 (PBS-M-Tw) y se añaden proteínas de fusión durante 1-2 horas a 37 °C. Después del lavado, se añade un anticuerpo anti-IL-2 marcado con biotina, por ejemplo, JES5H4 (BD Pharmingen) y se detecta la unión usando Estreptavidina HRP (Southern Biotechnology Associates; Birmingham, Ala.). La placa ELISA se desarrolló mediante la adición de 50 μ l de O-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) en Citrato 0.1 M pH 4.5 y 0.04 % de H₂O₂, se detuvo mediante la adición de 50 μ l/pocillo H₂SO₄ 2N y la absorbancia se leyó a 490 nm.

Ejemplo 2: Escisión por proteasa de proteína de fusión por la proteasa MMP9

Un experto en la técnica estaría familiarizado con los métodos para establecer un ensayo de escisión de proteínas. Se escindieron 100 μ g de proteína en 1xPBS pH 7.4 con 1 μ g de MMP9 activa (catálogo Sigma no. SAE0078-50 o catálogo Enzo BML-SE360) y se incubaron a temperatura ambiente durante hasta 16 horas. La proteína digerida se usa posteriormente en ensayos funcionales o se almacena a -80°C antes de la prueba. La extensión de la escisión se controló mediante SDS PAGE usando métodos bien conocidos en la técnica. Como se muestra en la **Figura 10** se observa una escisión completa de las proteínas de fusión por la proteasa MMP9.

Ejemplo 3: Ensayo en CTLL-2

Las células CTLL2 (ATCC) se colocaron en placas en suspensión a una concentración de 500,000 células/pocillo en un medio de cultivo con o sin 40 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) y se estimularon con una serie de diluciones de hIL2 recombinante o hIL2 activable durante 72 horas a 37°C y 5 % CO₂. Se ensayó la actividad de la hIL2 activable no escindida y escindida. La hIL2 activable escindida se generó mediante incubación con MMP9 activa. La actividad celular se evaluó usando un ensayo de viabilidad celular basado en luminiscencia CellTiter-Glo (Promega). Los resultados se muestran en las **Figuras 7-9**.

Ejemplo 4: La escisión por proteasa del polipéptido quimérico IL-2/IL-2R α /IL-2R γ da lugar a una mayor accesibilidad a los anticuerpos y la muteína de IL-2 biológicamente activa

Las proteínas de fusión de muteína de IL-2 se caracterizan bioquímicamente antes y después de la escisión con una proteasa, por ejemplo, PSA. Los análisis de inmunotransferencia mostrarán que las proteínas de fusión pueden ser escindidas por PSA y que hay un aumento en la intensidad del producto de escisión de bajo peso molecular previsto de aproximadamente 20 kDa reactivo con un anticuerpo anti-IL-2 después del tratamiento de las muestras con PSA. El grado de escisión depende de la cantidad de PSA y del tiempo de incubación. Curiosamente, cuando la proteína de fusión se analiza antes y después del tratamiento con PSA mediante ELISA, se encontró que la cantidad aparente de IL-2 aumenta después de la escisión del PSA. En este experimento, hay un aumento de aproximadamente 2 o 4 veces en la cantidad aparente de IL-2 detectada usando este ELISA sándwich dependiendo de la construcción, lo que sugiere que la unión del anticuerpo está parcialmente obstaculizada en la proteína de fusión intacta. También se analizan alícuotas de las mismas muestras después del tratamiento con PSA utilizando la línea celular CTLL-2 que requiere IL-2 para el crecimiento y la supervivencia, y la viabilidad de las células puede determinarse utilizando el ensayo colorimétrico MTT. En este ensayo, cuanto más se puede diluir un sobrenadante, más IL-2 biológicamente activa contiene, y hay un aumento en la cantidad de IL-2 biológicamente activa después de la escisión del PSA. El aumento de la cantidad de muteína de IL-2 sugerirá que después de la escisión del PSA hay un aumento

en el fragmento de escisión de bajo peso molecular previsto de aproximadamente 20 kDa reactivo con un anticuerpo anti-IL-2, un aumento en la accesibilidad del anticuerpo y, lo que es más importante, un aumento en la cantidad de muteína de IL-2 biológicamente activa.

5 **Ejemplo 5. La administración *in vivo* de una proteína de fusión activada por proteasa da lugar a una disminución del crecimiento tumoral**

El polipéptido quimérico se examina para determinar si podría tener efectos biológicos *in vivo*. Para estos experimentos se utiliza un sistema en el que las células tumorales inyectadas intraperitonealmente rápidamente y preferentemente se adhieren y crecen inicialmente en las manchas lechosas, una serie de agregados inmunes organizados que se encuentran en el epiplón (Gerber et al., Am. J. Pathol. 169: 1739-52 (2006)). Este sistema ofrece una forma conveniente de examinar los efectos del tratamiento con proteínas de fusión sobre el crecimiento tumoral, ya que las proteínas de fusión pueden administrarse intraperitonealmente varias veces y el crecimiento tumoral puede analizarse examinando las células del epiplón disociadas. Para estos experimentos, puede usarse la línea celular Colon 38, una línea celular tumoral de crecimiento rápido que expresa tanto MMP2 como MMP9 *in vitro*. El tejido del epiplón normalmente expresa una cantidad relativamente pequeña de MMP2 y MMP9, pero cuando el tumor de Colon 38 está presente en el epiplón, los niveles de MMP aumentan. Usando este modelo de tumor, se examina la capacidad de las proteínas de fusión de muteína IL-2 para afectar el crecimiento del tumor. Las células de Colon 38 se inyectan intraperitonealmente, se dejan adherir y crecer durante 1 día, y luego se tratan diariamente con proteína de fusión interaperitonealmente. El día 7, los animales se sacrifican y el epiplón se examina para determinar el crecimiento tumoral usando citometría de flujo y mediante un ensayo de formación de colonias.

25 **Ejemplo 6: Construcción de una proteína IL2 activable ejemplar dirigida a CD20**

25 *Generación de un dominio de IL2 activable*

Un polipéptido de IL-2 capaz de unirse al polipéptido CD20 presente en un tumor o en una célula tumoral se produce como sigue. Se produce un ácido nucleico que contiene secuencias de ácido nucleico: (1) que codifican una secuencia polipeptídica de IL-2 y (2) uno o más enlazadores polipeptídicos. Las construcciones de plásmido de interleucina activable pueden tener Flag, His u otras etiquetas de afinidad opcionales, y se someten a electroporación en HEK293 u otras líneas celulares de mamíferos o humanos adecuadas y se purifican. Los ensayos de validación incluyen ensayos de activación de linfocitos T que utilizan linfocitos T que responden a la estimulación de IL-2 en presencia de una proteasa.

35 *Generación de un dominio de unión scFv a CD20*

CD20 es una de las proteínas de la superficie celular presente en los linfocitos B. El antígeno CD20 se encuentra en linfocitos B maduros y pre-B normales y malignos, incluidos los de más del 90 % de los linfomas no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés) de linfocitos B. El antígeno está ausente en las células madre hematopoyéticas, los linfocitos B activados (células plasmáticas) y el tejido normal. Como tal, se han descrito varios anticuerpos en su mayoría de origen murino: 1F5, 2B8/C2B8, 2H7 y 1H4.

Por lo tanto, se utilizan anticuerpos anti-CD20 humanos o humanizados para generar secuencias scFv para los dominios de unión a CD20 de una proteína de interleucina activable. Se obtienen secuencias de ADN que codifican dominios VL y VH humanos o humanizados y, opcionalmente, los codones para las construcciones se optimizan para la expresión en células de Homo sapiens. El orden en el que aparecen los dominios VL y VH en scFv varía (es decir, orientación VL-VH o VH-VL), y tres copias de la subunidad "G4S" o "G₄S" (G₄S)₃ conectan los dominios variables para crear el dominio scFv. Las construcciones de plásmido scFv anti-CD20 pueden tener Flag, His opcionales u otras etiquetas de afinidad, y se someten a electroporación en HEK293 u otras líneas celulares de mamíferos o humanos adecuadas y se purifican. Los ensayos de validación incluyen análisis de unión por FACS, análisis cinético usando Proteon y tinción de células que expresan CD20.

55 *Clonación de construcciones de expresión de ADN que codifican la proteína IL2 activable*

La construcción de IL2 activable con dominios de sitio de escisión de proteasa se usa para construir una proteína de interleucina activable en combinación con un dominio scFv anti-CD20 y un elemento de extensión de la semivida sérica (por ejemplo, un péptido de unión a HSA o dominio VH). Para la expresión de una proteína de interleucina activable en células CHO, las secuencias codificantes de todos los dominios proteicos se clonan en un sistema de vector de expresión de mamífero. En resumen, las secuencias de genes que codifican el dominio de interleucina activable, el elemento de extensión de la semivida sérica y el dominio de unión a CD20 junto con los enlazadores peptídicos L1 y L2 se sintetizan y subclonan por separado. Las construcciones resultantes luego se ligan en el orden de dominio de unión a CD20 - L1 - subunidad 1 de IL2 - L2 - dominio de escisión de proteasa - L3 - subunidad 2 de IL2 - L4 - scFv anti-CD20 - L5 - elemento de extensión de la semivida sérica para producir una construcción final. Todas las construcciones de expresión están diseñadas para contener secuencias codificantes para un péptido señal de extremo N y una etiqueta de hexahistidina (6xHis)

de extremo C para facilitar la secreción y purificación de proteínas, respectivamente.

Expresión de proteínas IL2 activables en células CHO transfectadas de forma estable

5 Se utiliza un sistema de expresión de células CHO (Flp-In®, Life Technologies), un derivado de células de ovario de hámster chino CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao y Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968;60(4):1275-81). Las células adherentes se subcultivan de acuerdo con los protocolos de cultivo celular estándar proporcionados por Life Technologies.

10 Para la adaptación al crecimiento en suspensión, las células se despegan de los matraces de cultivo de tejidos y se colocan en un medio sin suero. Las células adaptadas a la suspensión se criopreservan en un medio con DMSO al 10 %.

15 Las líneas celulares CHO recombinantes que expresan de forma estable proteínas de interleucina activables secretadas se generan mediante transfección de células adaptadas a la suspensión. Durante la selección con el antibiótico higromicina B, se miden las densidades de células viables dos veces a la semana, y las células se centrifugan y se vuelven a suspender en el medio de selección fresco a una densidad máxima de 0.1×10^6 células viables/ml. Los conjuntos de células que expresan de manera estable proteínas de interleucina activables se recuperan después de 2-3 semanas de selección, momento en el que las células se transfieren a un medio de cultivo estándar en matraces agitados. La expresión de proteínas secretadas recombinantes se confirma realizando electroforesis en gel de proteínas o citometría de flujo. Los conjuntos de células estables se criopreservan en medio que contiene DMSO.

25 Las proteínas de IL2 activables se producen en cultivos de alimentación por lotes de 10 días de líneas celulares CHO transfectadas de manera estable mediante secreción en el sobrenadante del cultivo celular. Los sobrenadantes del cultivo celular se recolectan después de 10 días con una viabilidad de cultivo típicamente >75 %. Se recogen muestras de los cultivos de producción cada dos días y se evalúa la densidad y viabilidad celular. El día de la recolección, los sobrenadantes del cultivo celular se aclaran mediante centrifugación y filtración al vacío antes de su uso posterior.

30 La titulación de expresión de proteínas y la integridad del producto en los sobrenadantes de cultivos celulares se analizan mediante SDS-PAGE.

Purificación de proteínas IL2 activables

35 Las proteínas IL2 activables se purifican a partir de sobrenadantes de cultivos de células CHO en un procedimiento de dos etapas. Las construcciones se someten a cromatografía de afinidad en una primera etapa seguida de cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) en Superdex 200 en una segunda etapa. Las muestras se intercambian con tampón y se concentran mediante ultrafiltración hasta alcanzar una concentración típica de >1 mg/ml. La pureza y homogeneidad (típicamente >90 %) de las muestras finales se evalúan mediante SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, seguido de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-HSA o anti-idiotipo así como por SEC analítico, respectivamente. Las proteínas purificadas se almacenan en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

45 Ejemplo 7: Determinación de la afinidad por el antígeno por citometría de flujo

Las proteínas de IL2 activables del Ejemplo 6 se ensayan para determinar sus afinidades de unión a células CD20⁺ humanas y células CD20⁺ de cynomolgus.

50 Se incuban células CD20⁺ con 100 µl de diluciones en serie de las proteínas interleucinas activables del Ejemplo 6 y al menos una proteasa. Después de lavar tres veces con tampón FACS, las células se incuban con 0.1 ml de 10 µg/ml de anticuerpo anti-idiotipo monoclonal de ratón en el mismo tampón durante 45 min en hielo. Después de un segundo ciclo de lavado, las células se incuban con 0.1 ml de 15 µg/ml de anticuerpos IgG de cabra anti-ratón conjugados con FITC en las mismas condiciones que antes. Como control, las células se incuban con IgG anti-His seguido de anticuerpos IgG anti-ratón de cabra conjugados con FITC sin las proteínas IL2 activables. A continuación, las células se lavaron de nuevo y se volvieron a suspender en 0.2 ml de tampón FACS que contenía 2 µg/ml de yoduro de propidio (PI) para excluir las células muertas. La fluorescencia de 1×10^4 células vivas se mide usando un citómetro de flujo Beckman-Coulter FC500 MPL usando el software MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) o un citómetro de flujo Millipore Guava EasyCyte usando el software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemania). Las intensidades medias de fluorescencia de las muestras de células se calculan usando software CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) o software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemania). Después de restar los valores de intensidad de fluorescencia de las células teñidas con los reactivos secundarios y terciarios solos, los valores se utilizan para calcular los valores de K_D con la ecuación de unión en un sitio (hipérbola) del GraphPad Prism (versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California EE. UU.).

La unión y la reactividad cruzada de CD20 se evalúan en las líneas celulares tumorales humanas CD20⁺. La relación K_D de reactividad cruzada se calcula usando los valores K_D determinados en las líneas celulares CHO que expresan antígenos recombinantes humanos o de cynomolgus recombinantes.

5 Ejemplo 8: Ensayo de citotoxicidad

La proteína IL2 activable del Ejemplo 6 se evalúa *in vitro* en su mediación de la respuesta inmune a las células objetivo CD20⁺.

- 10 Las células CD20⁺ REC-1 marcadas con fluorescencia (una línea celular de linfoma de células del manto, ATCC CRL-3004) se incuban con PBMC aisladas de donantes aleatorios o linfocitos T CB15 (línea de linfocitos T estandarizadas) como células efectoras en presencia de la proteína IL2 activable del Ejemplo 6 y al menos una proteasa. Después de la incubación durante 4 h a 37 °C en una incubadora humidificada, se determina la liberación del tinte fluorescente de las células objetivo en el sobrenadante en un espectrofluorímetro. Las
- 15 células objetivo incubadas sin la proteína IL2 activable del Ejemplo 6 y las células objetivo totalmente lisadas mediante la adición de saponina al final de la incubación sirven como controles negativos y positivos, respectivamente.

- 20 Sobre la base de las células objetivo vivas restantes medidas, el porcentaje de lisis celular específico se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula: $[1 - (\text{número de objetivos vivos}_{\text{(muestra)}} / \text{número de objetivos vivos}_{\text{(espontáneo)}})] \times 100 \%$. Las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y los valores de EC_{50} se calculan por regresión no lineal/ajuste logístico de 4 parámetros usando el software GraphPad. Los valores de lisis obtenidos para una concentración de anticuerpo determinada se utilizan para calcular las curvas de respuesta a la dosis sigmoidea mediante un análisis de ajuste logístico de 4 parámetros utilizando el software Prism.

25

Ejemplo 9: Farmacocinética de proteínas IL2 activables

La proteína IL2 activable del Ejemplo 6 se evalúa para la eliminación a medio tiempo en estudios con animales.

- 30 La proteína IL2 activable se administra a monos cynomolgus como una inyección en bolo de 0.5 mg/kg en la vena safena. Otro grupo de monos cynomolgus recibe una construcción de IL2 comparable en tamaño, pero carece de un elemento de extensión de la semivida sérica. Un tercer y cuarto grupo reciben una construcción de IL2 con elemento de extensión de la semivida sérica y una citocina con CD20 y elementos de extensión de la semivida sérica respectivamente, y ambos comparables en tamaño a la proteína interleucina activable. Cada
- 35 grupo de prueba consta de 5 monos. Se toman muestras de suero en los puntos de tiempo indicados, se diluyen en serie y se determina la concentración de las proteínas usando un ELISA de unión a CD20.

- El análisis farmacocinético se realiza utilizando las concentraciones plasmáticas del artículo de prueba. Los datos de plasma medios de grupo para cada artículo de prueba se ajustan a un perfil multiexponencial cuando se grafican contra el tiempo posterior a la dosificación. Los datos se ajustan mediante un modelo estándar de dos compartimentos con entrada de bolo y constantes de velocidad de primer orden para las fases de distribución y eliminación. La ecuación general para el mejor ajuste de los datos para la administración i.v. es: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, donde $c(t)$ es la concentración plasmática en el momento t , A y B son intersecciones en el eje Y , y α y β son las constantes de velocidad aparentes de primer orden para las fases de distribución y eliminación, respectivamente. La fase α es la fase inicial del aclaramiento y refleja la distribución de la proteína en todo el líquido extracelular del animal, mientras que la segunda parte o fase β de la curva de desintegración representa el aclaramiento plasmático real. Los métodos para ajustar dichas ecuaciones son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta)$, y α y β (para $\alpha > \beta$) son raíces de la ecuación cuadrática: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ usando los parámetros estimados de V =volumen de
- 40 se grafican contra el tiempo posterior a la dosificación. Los datos se ajustan mediante un modelo estándar de dos compartimentos con entrada de bolo y constantes de velocidad de primer orden para las fases de distribución y eliminación. La ecuación general para el mejor ajuste de los datos para la administración i.v. es: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, donde $c(t)$ es la concentración plasmática en el momento t , A y B son intersecciones en el eje Y , y α y β son las constantes de velocidad aparentes de primer orden para las fases de distribución y eliminación, respectivamente. La fase α es la fase inicial del aclaramiento y refleja la distribución de la proteína en todo el líquido extracelular del animal, mientras que la segunda parte o fase β de la curva de desintegración representa el aclaramiento plasmático real. Los métodos para ajustar dichas ecuaciones son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta)$, y α y β (para $\alpha > \beta$) son raíces de la ecuación cuadrática: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ usando los parámetros estimados de V =volumen de
- 45 distribución, k_{10} =tasa de eliminación, k_{12} =tasa de transferencia del compartimento 1 al compartimento 2 y k_{21} =tasa de transferencia del compartimento 2 al compartimento 1, y D =la dosis administrada.
- 50

- Análisis de datos: Los gráficos de los perfiles de concentración frente al tiempo se realizan utilizando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Software de sinergia. Reading, Pa). Los valores
- 55 informados como menos que informables (LTR, por sus siglas en inglés) no se incluyen en el análisis PK y no se representan gráficamente. Los parámetros farmacocinéticos se determinan mediante análisis compartimental utilizando el software WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, California). Los parámetros farmacocinéticos se calculan como se describe en Ritschel WA y Kearns GL, 1999, EN: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 5ª edición, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D.C.
- 60

Se espera que la proteína IL2 activable del Ejemplo 6 tenga parámetros farmacocinéticos mejorados tales como un aumento en el tiempo medio de eliminación en comparación con las proteínas que carecen de un elemento de extensión de la semivida sérica.

65

Ejemplo 10: Modelo tumoral de xenoinjerto

La proteína IL2 activable del Ejemplo 6 se evalúa en un modelo de xenoinjerto.

Se irradian ratones NOD/SCID hembra inmunodeficientes subletalmente (2 Gy) y por vía subcutánea inoculados con 4×10^6 células Ramos RA1 en el flanco dorsal derecho. Cuando los tumores alcanzan de 100 a 200 mm³, los animales se dividen en 3 grupos de tratamiento. Los grupos 2 y 3 (8 animales cada uno) se inyectan intraperitonealmente con 1.5×10^7 linfocitos T humanos activados. Tres días después, los animales del Grupo 3 se tratan posteriormente con un total de 9 dosis intravenosas de 50 µg de proteína interleucina activable del Ejemplo 6 (qdx9d). Los grupos 1 y 2 solo se tratan con vehículo. El peso corporal y el volumen del tumor se determinan durante 30 días.

Se espera que los animales tratados con la proteína IL2 activable del Ejemplo 6 tengan un retraso estadísticamente significativo en el crecimiento del tumor en comparación con el grupo de control tratado con vehículo respectivo.

Aunque en la presente se han mostrado y descrito realizaciones preferidas de la presente invención, resultará evidente para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo únicamente. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención como se define por las reivindicaciones. Se entenderá que, en la práctica de la invención, se pueden emplear varias alternativas a las realizaciones de la invención que se describieron en la presente. Se pretende que las reivindicaciones siguientes definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones sean abarcados por estas.

Ejemplo 11: Ensayo HEK Blue

Las células HEK-Blue IL2 (InvivoGen) se sembraron en placas en suspensión a una concentración de 50,000 células/pocillo en un medio de cultivo con o sin 15-40 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) y se estimularon con una serie de diluciones de hIL2 recombinante o hIL2 activable durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Se ensayó la actividad de hIL2 activable no escindida y escindida. Se generó hIL2 inducible escindida mediante incubación con MMP9 activa. La actividad de IL12 se evaluó mediante la cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) utilizando el reactivo QUANTI-Blue (InvivoGen), un ensayo basado en colorimetría. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Ejemplo 12: Experimentos en MC38

Se utilizó la línea celular MC38, una línea celular de adenocarcinoma de colon de rápido crecimiento que expresa MMP9 *in vitro*. Usando este modelo de tumor, se examinó la capacidad de las proteínas de fusión para afectar el crecimiento del tumor.

Ejemplo 12a MC38 IL-2POC

Agentes y tratamiento:

Gr.	N	Agente	Dosis de la formulación	Vía	Cronograma
1#	10	Vehicle	-	ip	bisem x 3
2	7	ACP16	700 µg/animal	ip	bisem x 3
3	7	ACP16	230 µg/animal	ip	bisem x 3
4	7	ACP16	70 µg/animal	ip	bisem x 3
5	7	ACP16	55 ug/animal	ip	bisem x 3
6	7	ACP16	17 µg/animal	ip	bisem x 3
7	7	ACP132	361 µg/animal	ip	bisem x 3
8	7	ACP132	119 µg/animal	ip	bisem x 3
9	7	ACP132	36 µg/animal	ip	bisem x 3
10	7	ACP132	28 µg/animal	ip	bisem x 3
11	7	ACP132	9 µg/animal	ip	bisem x 3
12	7	ACP21	540 µg/animal	ip	bisem x 3

Gr.	N	Agente	Dosis de la formulación	Vía	Cronograma
13	7	ACP21	177 µg/animal	ip	bisem x 3
14	7	ACP21	54 µg/animal	ip	bisem x 3
15	7	ACP21	42 µg/animal	ip	bisem x 3
16	7	ACP21	13 µg/animal	ip	bisem x 3
17	7	ACP133	210 µg/animal	ip	bid x 5 luego pausa de 2 días luego bid x 5 luego pausa de 2 días
18	7	ACP133	105 µg/animal	ip	bid x 5 luego pausa de 2 días luego bid x 5 luego pausa de 2 días
19	7	ACP133	40 µg/animal	ip	bid x 5 luego pausa de 2 días luego bid x 5 luego pausa de 2 días
20	7	ACP133	3 µg/animal	ip	bid x 5 luego pausa de 2 días luego bid x 5 luego pausa de 2 días
#- Grupo de Control					

Ejemplo 12b: MC38 IL-2**Agentes y tratamiento:**

5

Gr.	N	Agente	Dosis de la formulación	Vía	Cronograma
1#	12	Vehículo	-	ip	bisem x 2
2	8	ACP16	4.4 µg/animal	ip	bisem x 2
3	8	ACP16	17 µg/animal	ip	bisem x 2
4	8	ACP16	70 µg/animal	ip	bisem x 2
5	8	ACP16	232 µg/animal	ip	bisem x 2
6	8	ACP130	19 µg/animal	ip	bisem x 2
7	8	ACP130	45 µg/animal	ip	bisem x 2
8	8	ACP130	180 µg/animal	ip	bisem x 2
9	8	ACP130	600 µg/animal	ip	bisem x 1
12	8	ACP124	17 µg/animal	ip	bisem x 2
13	8	ACP124	70 µg/animal	ip	bisem x 2
14	8	ACP124	230 µg/animal	ip	bisem x 2
15	8	ACP124	700 µg/animal	ip	bisem x 2
16	8	IL-2-WTI	12 µg/animal	ip	bid x 5 luego pausa de 2 días luego bid x 5 luego pausa de 2 días
17	8	IL-2-WTI	36 µg/animal	ip	bid x 5 luego pausa de 2 días luego bid x 5 luego pausa de 2 días
#- Grupo de Control					

Ejemplo 12c: Tratamiento con ACP16, ACP132, y ACP21

- Los ratones fueron anestesiados con isoflurano para el implante de células para reducir las ulceraciones. Se prepararon ratones CR hembra C57BL/6 con 5×10^5 células tumorales MC38 en 0 % de Matrigel sc en el flanco. El volumen de inyección celular fue de 0.1 ml/ratón. La edad del ratón en la fecha de inicio fue de 8 a 12 semanas. Los emparejamientos por parejas se realizaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 - 150 mm³ y comenzaron el tratamiento. El ACP16 se dosificó a 17, 55, 70 o 230 ug/animal; se dosificó ACP132 a 9, 28, 36 o 119 ug/animal; se dosificó ACP21 a 13, 42, 54 o 177 ug/animal. Se tomaron los pesos corporales al inicio y luego bisemanalmente hasta el final. Las medidas del calibre se tomaron bisemanalmente

hasta el final. Cualquier reacción adversa debía notificarse inmediatamente. Se sacrificó a todo animal individual con una única observación de >30 % de pérdida de peso corporal o tres mediciones consecutivas de >25 % de pérdida de peso corporal. Se dejó de administrar la dosis a cualquier grupo con una pérdida de peso corporal media de >20 % o >10 % de mortalidad; el grupo no fue sacrificado y se permite la recuperación. Dentro de un grupo con >20 % de pérdida de peso, los individuos que alcanzaron el punto final de pérdida de peso corporal individual fueron sacrificados. Si la pérdida de peso corporal relacionada con el tratamiento de grupo se recupera dentro del 10 % de los pesos originales, la dosificación se reanuda con una dosis menor o con un cronograma de tratamiento menos frecuente. Las excepciones al % de recuperación del peso corporal sin tratamiento se permitieron, caso por caso. El punto final fue el retraso del crecimiento tumoral (TGD). Los animales se controlaron individualmente. El punto final del experimento fue un volumen tumoral de 1500 mm³ o 45 días, lo que ocurra primero. Se siguieron los respondedores por más tiempo. Cuando se alcanza el punto final, los animales deben ser sacrificados. Los resultados se muestran en la Figura 17.

Ejemplo 12d: Reexposición a MC38

Los ratones curados (tratados con ACP16) del Ejemplo 12b se volvieron a exponer a la implantación de un tumor para determinar si se había establecido la memoria antitumoral a partir de los tratamientos iniciales.

Agentes y tratamiento:

Gr.	N	Agente	Dosis de la formulación	Vía	Cronograma
1 [#]	33	Sin Tratamiento	-	-	-
2	7	ACP16	70 µg/animal	ip	(ACP16 bisemx2)
3	8	ACP16	232 µg/animal	ip	(ACP16 bisemx2)
5	5	IL-2-WTI	12 µg/animal	ip	(IL-2-WTI bid x 5, luego pausa de 2 días, luego bid x 5 y luego pausa de 2 días)
6	7	IL-2-WTI	36 µg/animal	ip	(IL-2-WTI bid x 5, luego pausa de 2 días, luego bid x 5 y luego pausa de 2 días)
#- Grupo de Control					

Procedimientos:

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano para el implante de células para reducir las ulceraciones. Esta parte del estudio comenzó el día del implante (Día 1). El grupo 1 consistió en 33 ratones hembra CR C57BL/6 preparados con 5x10⁵ células tumorales MC38 en Matrigel al 0 % por vía subcutánea en el flanco. Los grupos 2-6 consistieron en 33 ratones hembra CR C57BL/6 preparados con 5x10⁵ células tumorales MC38 en Matrigel sc al 0 % en el flanco izquierdo. Los tumores del experimento MC38 anterior (Ejemplo 12b) se implantaron en el flanco derecho de cada animal. El volumen de inyección celular fue de 0.1 ml/ratón. La edad de los ratones de control al inicio fue de 14 a 17 semanas. Estos ratones tenían la misma edad que los ratones del experimento MC38 anterior (Ejemplo 12b). No se produjo ninguna dosificación del agente activo durante la reexposición. Los pesos corporales se tomaron bisemanalmente hasta el final, al igual que las mediciones con calibrador. Cualquier reacción adversa o muerte se informó de inmediato. Se sacrificó a todo animal individual con una única observación de >30 % de pérdida de peso corporal o tres mediciones consecutivas de >25 % de pérdida de peso corporal. El punto final fue el retraso del crecimiento tumoral (TGD). Los animales se controlaron individualmente. El punto final del experimento fue un volumen tumoral de 1000 mm³ o 45 días, lo que ocurra primero. Se siguieron los respondedores más tiempo cuando fue posible. Cuando se alcanzó el punto final, los animales fueron sacrificados. Los resultados se muestran en la Fig. 15.

Ejemplo 13. Proteínas de fusión condicionalmente activas que contienen un resto de bloqueo que es un dominio de unión a la albúmina sérica

Este ejemplo describe la producción y actividad de proteínas de fusión, preferiblemente citocinas, que tienen actividad inducible, es decir, están inactivas hasta que son inducidas, típicamente por separación de un resto de bloqueo del resto activo tras la escisión de un enlazador entre el resto de bloqueo y el resto activo. Las proteínas de fusión contienen un único dominio variable de anticuerpo (un dAb) que se une a la albúmina sérica a través de los bucles de CDR y se une a un resto activo (en este caso, un scFV anti-CD3) a través de uno o más bucles sin CDR (p. ej., el bucle C). El resto de bloqueo de la unión de la albúmina sérica está operativamente ligado al resto activo a través de un enlazador escindible por proteasa, y el resto activo está operativamente ligado a un dominio de direccionamiento (en este caso, un receptor del factor de crecimiento anti-epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) dAb o antígeno de membrana antiprostático específico (PSMA,

por sus siglas en inglés) dAb) a través de un enlazador que no es escindible por proteasa. Estas proteínas de fusión se pueden administrar como proteínas inactivas que se activan tras la escisión del enlazador escindible por proteasa y la posterior liberación del dominio inhibidor de unión a albúmina. El scFV anti-CD3 en las proteínas de fusión es un sustituto de una citocina deseada en las proteínas de fusión descritas en esta descripción. Proteínas de fusión similares que contienen una citocina deseada (p. ej., IL-2, IL-12, un interferón) o un fragmento funcional o muteína del mismo, un dominio de direccionamiento y un dAb de unión a albúmina que también se une e inhibe la citocina o el fragmento funcional o muteína del mismo se puede preparar usando los métodos descritos y ejemplificados en la presente. El dAb anti-albúmina sérica que se une e inhibe la actividad de una citocina deseada o fragmento funcional o muteína de la misma puede proporcionar tanto enmascaramiento estérico de la citocina (a través de la proximidad de las citocinas a la albúmina sérica unida) como enmascaramiento específico de la citocina (a través de la unión a la citocina a través del bucle sin CDR (por ejemplo, el bucle C)). El dAb anti-albúmina sérica que se une e inhibe la actividad de una citocina deseada o fragmento funcional o muteína de la misma puede obtenerse usando métodos adecuados, tales como introduciendo diversidad de secuencia de aminoácidos en los bucles sin CDR (p. ej. el bucle C) de una anti-albúmina sérica que se une a dAb y mediante cribado para la unión a la citocina deseada. Se puede utilizar cualquier método adecuado para la selección, como la presentación de fagos. Por ejemplo, un dAb anti-albúmina sérica ejemplar que puede usarse tiene la siguiente secuencia, y la secuencia de aminoácidos en el bucle C (subrayado en negrita) puede diversificarse (p. ej., aleatorizar) y los dAb resultantes cribados para la unión a albúmina sérica a través de interacción CDR y citocina a través de interacción de bucle sin CDR. Si se desea, la secuencia de aminoácidos de un péptido de unión a citocinas conocido puede injertarse en el bucle C.

EVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSI
SGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTGLVTVS
S (SEQ ID NO: 137)

25 A. La activación por proteasa de ProTriTAC conduce a una actividad significativamente mejorada *in vitro*

Se analizaron ProTriTAC purificado (profármaco), ProTriTAC no escindible [profármaco (no escindible)] y el fragmento de fármaco activo recombinante que imita al ProTriTAC (fármaco activo) activado por proteasa para determinar la unión a CD3 humana recombinante en un ensayo ELISA, unión a linfocitos T primarios humanos purificados en un ensayo de citometría de flujo, y potencia funcional en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T.

Para ELISA, se incubaron proteínas solubles ProTriTAC a las concentraciones indicadas con CD3e humana recombinante inmovilizada (R&D Systems) durante 1 h a temperatura ambiente en PBS suplementado con 15 mg/ml de albúmina sérica humana. Las placas se bloquearon usando SuperBlock (Thermo Fisher), se lavaron usando PBS con 0.05 % Tween-20 y se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-CD3 idiотipo no competitivo 11D3 seguido de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y una solución de sustrato de TMB-ELISA (Thermo Fisher).

Para la citometría de flujo, se incubaron proteínas solubles ProTriTAC a las concentraciones indicadas con linfocitos T primarios humanos purificados durante 1 h a 4 °C en presencia de PBS con suero bovino fetal al 2 % y 15 mg/ml de albúmina sérica humana. Las placas se lavaron con PBS con suero bovino fetal al 2 %, se detectaron usando el anticuerpo monoclonal idiотipo anti-CD3 no competitivo 11D3 marcado con AlexaFluor 647, y los datos se analizaron usando FlowJo 10 (FlowJo, LLC).

Para determinar la potencia funcional en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T, se incubaron proteínas ProTriTAC solubles en las concentraciones indicadas con linfocitos T humanos en reposo purificados (célula efectora) y célula cancerosa HCT116 (célula objetivo) a una relación de 10:1 efector:célula objetivo por 48 h a 37 °C. La línea celular objetivo HCT116 se ha transfectado de manera estable con un gen indicador de luciferasa para permitir la medición específica de la muerte de células mediada por linfocitos T mediante ONE-Glo (Promega).

B. ProTriTAC exhibe una potente actividad antitumoral dependiente de proteasa en un modelo de xenoinjerto tumoral de roedor

Se evaluó la actividad antitumoral de ProTriTAC *in vivo* en un tumor de xenoinjerto subcutáneo HCT116 mezclado con linfocitos T humanos expandidos en ratones NCG inmunodeprimidos. Específicamente, se mezclaron 5x10⁶ células HCT116 con 2.5x10⁶ linfocitos T expandidos por ratón en el día 0. La dosificación de ProTriTAC se realizó comenzando al día siguiente con un cronograma de q. d. x 10 mediante inyección intraperitoneal. Las medidas del volumen tumoral se determinaron usando medidas de calibre y se calcularon usando la fórmula $V = (\text{largo} \times \text{ancho} \times \text{ancho}) / 2$ en los tiempos indicados.

C. Expresión, purificación y estabilidad de moléculas triespecíficas de ProTriTAC ejemplares

Las secuencias que codifican moléculas de proteínas de fusión inducibles se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA 3.4 (Invitrogen) precedido por una secuencia líder y seguido por una etiqueta de histidina 6x (SEQ ID NO: 136). Las células Expi293F (Life Technologies A14527) se mantuvieron en suspensión en 5 matraces de crecimiento óptimo (Thomson) entre 0.2 y 8 x 1e6 células/ml en medio Expi 293. El ADN plasmídico purificado se transfectó en células Expi293 de acuerdo con los protocolos del kit de sistema de expresión Expi293 (Life Technologies, A14635) y se mantuvo durante 4-6 días después de la transfección. Alternativamente, las secuencias que codifican las moléculas de proteína de fusión se clonaron en el vector de 10 expresión de mamífero pDEF38 (CMC ICOS) transfectado en células CHO-DG44 dhfr-, se generaron conjuntos estables y se cultivaron en un medio de producción durante hasta 12 días antes de la purificación. La cantidad de proteínas de fusión ejemplares en medio acondicionado se cuantificó utilizando un instrumento Octet RED 96 con puntas de Proteína A (ForteBio/Pall) utilizando una proteína de fusión de control para una curva estándar. El medio acondicionado de cualquiera de las células huésped se filtró y se purificó parcialmente mediante 15 cromatografía de afinidad y desalación. Las proteínas de fusión se purificaron posteriormente mediante intercambio iónico y tras la combinación de fracciones se formularon en un tampón neutro que contenía excipientes. La pureza final se evaluó mediante SDS-PAGE y SEC analítico usando una columna Acquity BEH SEC 200 1.7u 4.6 x 150 mm (Waters Corporation) resuelta en una fase móvil acuosa/orgánica con excipientes a pH neutro en un sistema LC 1290 y picos integrados con Chemstation CDS software (Agilent). Las proteínas 20 de fusión purificadas a partir de células huésped CHO se muestran en la SDS-PAGE que se muestra a continuación.

Evaluación de estabilidad

25 Las proteínas de fusión purificadas en dos formulaciones se subdividieron en alícuotas en tubos estériles y se estresaron mediante cinco ciclos de congelación-descongelación que comprendían cada uno más de 1 hora a -80 °C y temperatura ambiente o por incubación a 37 °C durante 1 semana. Las muestras sometidas a estrés se evaluaron en cuanto a concentración y turbidez mediante espectrometría UV utilizando placas de 96 pocillos transparentes UV (Corning 3635) con un software SpectraMax M2 y SoftMaxPro (dispositivos moleculares), 30 SDS-PAGE y SEC analítico y se compararon con el mismo análisis de muestras no estresadas de control. A continuación, se representa una superposición de cromatogramas de SEC analítico de muestras de control y estresadas para una única molécula de ProTriTAC ejemplar purificada a partir de 293 células huésped.

Los resultados muestran que los ProTriTAC se produjeron con rendimientos comparables a los de los TriTAC 35 regulares a partir de grupos estables de CHO; y que las proteínas eran estables después de repetidas congelaciones-descongelaciones y a 37 °C durante 1 semana.

D. Demostración del enmascaramiento funcional y estabilidad de ProTriTAC in vivo en un estudio farmacocinético de tres semanas en monos cynomolgus

40 Se dosificó una dosis única de ProTriTAC dirigido a PSMA (SEQ ID NO: 119), ProTriTAC no escindible (SEQ ID NO: 120), TriTAC no enmascarado/no escindible (SEQ ID NO: 123) y ProTriTAC activado por proteasa que imita un fármaco activo (SEQ ID NO: 121) en monos cynomolgus a 0.1 mg/kg mediante inyección intravenosa. Se recogieron muestras de plasma en los puntos de tiempo indicados. Las concentraciones de ProTriTAC se 45 determinaron usando ensayos de unión de ligandos con PSMA humano recombinante biotinilado (sistemas de R&D) y anticuerpo de idiotipo anti-CD3 marcado con sulfo clonado 11D3 en un ensayo MSD (Meso Scale Diagnostic, LLC). Los parámetros farmacocinéticos se estimaron utilizando el software farmacocinético Phoenix WinNonlin utilizando un enfoque no compartimental compatible con la vía de administración en bolo intravenoso.

50 Para calcular la tasa de conversión de profármacos in vivo, se estimó la concentración de fármaco activo en circulación resolviendo el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales donde P es la concentración de profármaco, A es la concentración de fármaco activo, k_a es la tasa de activación de profármaco en circulación, $k_{c,P}$ es la tasa de aclaramiento del profármaco, y $k_{c,A}$ es la tasa de aclaramiento del fármaco activo.

$$55 \quad \frac{dP}{dt} = -k_{c,P}P$$

$$\frac{dA}{dt} = k_aP - k_{c,A}A$$

60 Las tasas de aclaramiento del profármaco, el fármaco activo y un control de profármaco no escindible ($k_{c,NCLV}$) se determinaron empíricamente en monos cynomolgus. Para estimar la tasa de activación del profármaco en circulación, asumimos que la diferencia entre la tasa de aclaramiento del profármaco escindible y el profármaco no escindible surgió únicamente de la activación no específica en circulación. Por lo tanto, la tasa de conversión del profármaco a fármaco activo en circulación se estimó restando la tasa de aclaramiento del profármaco

escindible del profármaco no escindible.

$$k_a = k_{c,NCLV} - k_{c,P}$$

- 5 La concentración inicial de profármaco en circulación se determinó empíricamente y se asumió que la concentración inicial de fármaco activo era cero.

Resultados y discusión

- 10 Los resultados del Ejemplo 13 muestran que se pueden preparar proteínas de fusión que contienen un polipéptido con la actividad terapéutica deseada, como una citocina o un fragmento funcional o muteína de la misma o scFV anti-CD3, en las que la actividad terapéutica está enmascarada por un dominio de enmascaramiento que se une tanto a la albúmina sérica como al polipéptido activo. El dominio de enmascaramiento está operativamente unido al dominio activo a través de un enlazador escindible por proteasa.
- 15 Los resultados muestran que este tipo de proteína de fusión puede administrarse como una proteína inactiva que se activa tras la escisión de la proteasa en la ubicación deseada de actividad terapéutica, como en un tumor.

- 20 Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión utilizadas en el Ejemplo 13 se proporcionan como SEQ ID NO: 116-123.

- Las construcciones de proteína de fusión de muestra se detallan en la Tabla 3. En la Tabla 3, "L" es una abreviatura de "enlazador" y "enlaz. esc." es una abreviatura de "enlazador escindible". Otras abreviaturas "mIFNg" indican interferón gamma de ratón (IFNg); "hAlbúmina" indica albúmina sérica humana (HSA);
- 25 "mAlbúmina" indica albúmina sérica de ratón.

Tabla 3: Tabla de permutación de construcciones

Nombre de la construcción	Descripción de la construcción
ACP63	anti-FN CGS-2 scFv (Vh/Vl)-6xHis
ACP12	(anti-EpCAM)-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-bloqueador-6xHis
ACP13	(anti-EpCAM)-Bloqueador2-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP14	Bloqueador2-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP15	Bloqueador2-Enlazador-(anti-HSA)-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP16	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-6xHis
ACP17	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-6xHis
ACP18	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-vh(enlaz. esc.)vl-6xHis
ACP19	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-Bloqueador2-Enlazador-(anti-HSA)-Enlazador-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP20	IL2-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-6xHis
ACP21	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-Bloqueador2-6xHis
ACP22	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-bloqueador-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP23	(anti-FOLR1)-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-Enlazador-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP24	(Bloqueador2)-(enlaz. esc.)-(IL2)-6xHis
ACP25	Bloqueador2-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP26	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-bloqueador(NARA1 Vh/Vl)
ACP27	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-bloqueador(NARA1 VI/Vh)
ACP28	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-Bloqueador2-(NARA1 Vh/Vl)-Enlazador-(anti-HSA)-Enlazador-(anti-EpCAM)
ACP29	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-Bloqueador2-(NARA1 VI/Vh)-Enlazador-(anti-HSA)-Enlazador-(anti-EpCAM)
ACP38	IL2-(enlaz. esc.)-bloqueador-(anti-HSA)-(anti-EpCAM)-6xHis

Nombre de la construcción	Descripción de la construcción
ACP39	(anti-EpCAM)-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP40	CD25ecd-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP41	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-CD25ecd-6xHis
ACP42	(anti-HSA)-Enlazador-CD25ecd-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP43	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-CD25ecd-Enlazador-(anti-HSA)-6xHis
ACP44	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-CD25ecd-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP45	(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP46	IL2-(enlaz. esc.)-enlazadorL-vh(enlaz. esc.)vl-enlazador-(anti-HSA)-L-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP47	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-(Enlazador escindible)-(anti-HSA)-Enlazador-Bloqueador2-6xHis
ACP48	IL2-(enlaz. esc.)-Bloqueador2-Enlazador-(anti-HSA)-6xHis
ACP49	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-Bloqueador2-Enlazador-(anti-HSA)-6xHis
ACP92	(anti-HSA)-(16mer Enlaz. esc.) - IL2- (16mer Enlaz. esc.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP93	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(anti-EpCAM)-Bloqueador2-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP94	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-Bloqueador2-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP95	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-IL2-6xHis
ACP96	(anti-EpCAM)-(16mer enlaz. esc.)-IL2-(16mer enlaz. esc.)-(anti-HSA)
ACP97	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP99	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP100	(anti-EpCAM)-Enlazador-IL2-6xHis
ACP101	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP102	(anti-EpCAM)-(enlaz. esc.)-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-bloqueador-6xHis
ACP103	IL2-(enlaz. esc.)-Enlazador-Bloqueador2-Enlazador-(anti-HSA)-Enlazador-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP104	(anti-FOLR1)-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-Bloqueador2-6xHis
ACP105	Bloqueador2-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-Enlazador-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP106	(anti-FOLR1)-Enlazador-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-bloqueador-Enlazador-(enlaz. esc.)-IL2 -6xHis
ACP107	Bloqueador2-Enlazador-(anti-HSA)-(enlaz. esc.)-IL2-Enlazador-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP108	(anti-EpCAM)-IL2-(enlaz. esc. doble)-(anti-HSA)-Enlazador-bloqueador-6xHis
ACP117	anti-FN CGS-2 scFv (Vh/Vl)-6xHis
ACP118	NARA1 Vh/Vl no escindible
ACP119	NARA1 Vh/Vl escindible
ACP120	NARA1 Vl/Vh no escindible
ACP121	NARA1 Vl/Vh escindible
ACP124	IL2-Enlazador-(anti-HSA)-Enlazador-Enlazador-bloqueador_(control_ no escindible)
ACP132	IL2-L-HSA
ACP141	IL2-L-hAlb
ACP142	IL2-(enlaz. esc.)-hAlb
ACP144	IL2-(enlaz. esc.)-HSA-LX-bloqueador-L-FOLR1
ACP145	FOLR1-L-IL2-(enlaz. esc.)-HSA-LX-bloqueador
ACP146	FOLR1-(enlaz. esc.)-IL2-(enlaz. esc.)-HSA-LX-bloqueador
ACP133	IL-2-6x His

Nombre de la construcción	Descripción de la construcción
ACP147	IL2-(enlaz. esc.)-HSA-LX-bloqueador-L-TAA
ACP148	TAA-L-IL2-(enlaz. esc.)-HSA-LX-bloqueador
ACP149	TAA-(enlaz. esc.)-IL2-(enlaz. esc.)-HSA-LX-bloqueador
ACP153	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-enlazador(enlaz. esc.)-bloqueador2
ACP154	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-enlazador(enlaz. esc.)-bloqueador2
ACP155	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-enlazador(enlaz. esc.)-bloqueador2
ACP156	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-enlazador(enlaz. esc.)-bloqueador2
ACP157	IL2-(enlaz. esc.)-(anti-HSA)-enlazador(enlaz. esc.)-bloqueador2

Tabla de secuencias

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
1	IL-2 humana	MYRMQLLSCL ALSALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVN LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIISTLT
2	Albúmina sérica humana	MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDSKL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFHQHK DDNPNLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETELK KYLYEIAARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDELRL DEGKASSAKQ GLKCASLQKF GERAFAKAWAV ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTKVHTECC HGDLLLECADD RADLAKYICE NQDSISSKLLK ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVGSKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYEYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIKQNCSELF QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDCLSVF LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNGRPFCSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHK PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDDKET CFAEEGKKLVAAASQAALGL

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
45	ACP12 (proteína de fusión de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVIYCNALYGTIDYWGKGTQVTVS Sgggsgggsgggsgggsaptsstktqlqlhllldlqmilinginnyknpltrmltfkfympkkateklhlqleceelkpleevl nlaqsknfhprdlisninivlelkgsettfmceyadetativefnlrwifcqsiiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgg ggsgggsgggsgggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLE WVAADSSSYTYSPDTRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNWD ALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGSDIQTSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYSAFRRYSGVPSRFSGGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYTYPTFGGGTKVEIKHHHHHH
46	ACP 13 (proteína de fusión de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVIYCNALYGTIDYWGKGTQVTVS SgggsgggsgggsgggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGK LEWVAADSSSYTYSPDTRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDN WDALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGSDIQTSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYSAFRRYSGVPSRFSGGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYYTYPTFGGGTKVEIKggggsgggsgggsEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSGGPGPAGMKGLPGSaptss stktktqlqlhllldlqmilinginnyknpltrmltfkfympkkateklhlqleceelkpleevl nlaqsknfhprdlisninivlelkgsettfmceyadetativefnlrwifcqsiiistltHHHHHHH

(continuación)

[illegible]

(continuación)

[illegible]

[illegible]

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
53	ACP20 (proteína de fusión de IL2)	aptssstktqlqllehlldlqmilnginnyknpktrmltftkfymppkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisinin viv/lelkgsettfmceyadetativeflnrwiftfcqsiistltSGGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSPDTRGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNSNWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIY ASFRYSGVPSRFSGSGGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYYTYPTYTFGGGTKVEIKH HHHHH
54	ACP21 (proteína de fusión de IL2)	aptssstktqlqllehlldlqmilnginnyknpktrmltftkfymppkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisinin viv/lelkgsettfmceyadetativeflnrwiftfcqsiistltSGGGPGPAGMKGLPGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGG ggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVA AIDSSSYTYSPDTRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNSNWDALD YWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV GTNVGWYQQKPGKAPKALIYASFRYSGVPSRFSGSGGTDFLTITSLQPEDFATYY CQYYTYPTYTFGGGTKVEIKHHHHH

51

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
57	ACP24 (proteína de fusión de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSY TYPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSDNALDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQPSSLASVGDRVTITCKASQNVTGNVGV YQQPKGKAPKALISASFYSVPSRFSGSFGTDFTLT TISSLPEDFATYYCQQYYT YPYTFTGGGTTVEIKSGGGPAGMKGLPGSaptssstktqlqlehlldlqmilinginnyknplktrmltfkf ympkkatelkhlcleeelkpleevlnlaqsknfhlpdrdlisinvivilekgsettfmceyadetativefhnrwitfcqsiiistltH HHHHH
58	ACP25 (proteína de fusión de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSY TYPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSDNALDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQPSSLASVGDRVTITCKASQNVTGNVGV YQQPKGKAPKALISASFYSVPSRFSGSFGTDFTLT TISSLPEDFATYYCQQYYT YPYTFTGGGTTVEIKggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsggGPAGMKGLPGSaptsstktk qlqlehlldlqmilinginnyknplktrmltfkympkkatelkhlcleeelkpleevlnlaqsknfhlpdrdlisinvivilekgs ettfmceyadetativefhnrwitfcqsiiistltHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
59	ACP26 (proteína de fusión de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFISIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTGVYYCNALYGT DYWGKGTQVTVS Sggsgsgsgsgsgsgsaptssstkkkqlqlhllldlqmilnginnynknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleelkpleevl nlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefhnrvitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgg ggsgsgsgsgsgsgsgsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQ GLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARW RGDGYAYFEDVWGAGTTVTVSSggsgsgsgsgsgsgsDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCK ASQSV DYGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGGTKLEIKHHHHHHHEPEA
60	ACP27 (proteína de fusión de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFISIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTGVYYCNALYGT DYWGKGTQVTVS Sggsgsgsgsgsgsgsaptssstkkkqlqlhllldlqmilnginnynknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleelkpleevl nlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefhnrvitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgg ggsgsgsgsgsgsgsgsDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCKASQSV DYGDSYMNWYQQK PGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTF GGGTKLEIKggsgsgsgsgsgsgsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEW VKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARWRGDGYAYFEDVWGAGTTVTVSSHHHHHHHEPEA

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
61	ACP28 (proteína de fusión de IL2)	aptsstsktkqlqlhlldlqmlingimnyknpktrmltfkfympkkatelkhlqlceelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisinin vivlclkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggsgsgsgsgsgsgsgsgsgsg gggsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINP GSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYAYF DVWGAGTTTVTVSSggsgsgsgsgsgsgsgsgsgsgDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDG DSYMNWYQQKPGQPKLLIYAASNLESIGIPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAATY YCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKggsgsgsgsgsgsgsgsgsgEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPETAIVYYCTIGGSLSVSSQGTLTVTSSggsgsgsgsgsgsgsgsgsgQVQLQESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTIDYWGKGTQVTVSSHHHHHHHEPEA
62	ACP29 (proteína de fusión de IL2)	aptsstsktkqlqlhlldlqmlingimnyknpktrmltfkfympkkatelkhlqlceelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisinin vivlclkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggsgsgsgsgsgsgsgsgsgsg gggsDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPKLLIYA ASNLESIGIPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKgg ggsgsgsgsgsgsgsgsgsgQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLE WIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGD GYAYYFDVWGAGTTTVTVSSggsgsgsgsgsgsgsgsgsgEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPETAIVYYCTIGGSLSVSSQGTLTVTSSggsgsgsgsgsgsgsgsgsgQVQLQESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTIDYWGKGTQVTVSSHHHHHHHEPEA

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
63	IL2Ra	10 20 30 40 50 MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTM LNCE 60 70 80 90 100 CKRGFRRIKS GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE 110 120 130 140 150 QKERKTTTEMQ SPMQPVVDQAS LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQM VYY 160 170 180 190 200 QC VQGYRALH RGP AESVCKM THGKTRWTQP QLICTGEMET SQFPGE EK PQ 210 220 230 240 250 ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ VAVAGCVFLL 260 270 ISVLLSGLT WQRRQRKSRR TI

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
64	IL2Rb	10 20 30 40 50 MAAPALSWRL PLLILLPLA TSWASAAVNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ 60 70 80 90 100 DQALQDTSQ VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWACNLIL GAPDSQKLTT 110 120 130 140 150 VDIVTLRVLC REGVRWRVMA IQDFKPFENL RLMAPISLQV VHVETHRCNI 160 170 180 190 200 SWEISQASHY FERHLEFEAR TSPGHTWEE APLLTLKQKQ EWICLETLTP 210 220 230 240 250 DTQYEFQVRV KPLQGEFTTW SPWSQPLAFR TKPAALGKDT IPWLGHLLVG 260 270 280 290 300 LSGAFGFHIL VYLLINCRNT GPWLKKVLKC NTPDPSKFFS QLSSEHGDDV 310 320 330 340 350 QKWLSSPFS SSFSPGGLAP EISPLEVLER DKVTQLLQKQ DKVPEPASLS 360 370 380 390 400 SNHSLTSCFT NQGYFFHLP DALEIEACQV YFTYDPYSEE DPDEGVAGAP 410 420 430 440 450 TGSSPQLQP LSGEDDAYCT FPSRDDLLLF SPSLLGGPSP PSTAPGSGA 460 470 480 490 500 GEERMPPSLQ ERVPRDWDPO PLGPPTPGVP DLVDFQPPPE LVLREAGEEV 510 520 530 540 550 PDAGPREGVS FPW'SRPPGQG EFRALNARLP LNTDAYLSLQ ELQGGDPHTL V

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
65	IL2Rg	10 20 30 40 50 MLKPSLPFTS LLFLQLPLLG VGLNTTILTP NGNEDTTADF FLTTMPTDSL 60 70 80 90 100 SVSTLPLPEV QCFVFNVEYM NCTWNSSSEP QPTNLTLYW YKNSDNDKVQ 110 120 130 140 150 KCSHYLFSEE ITSGCQLQKK EIHLYQTFVV QLQDPREPRR QATQMLKLQN 160 170 180 190 200 LVIPWAPENL TLHKLSQQL ELNWNRRFLN HCLEHLVQYR TDWDHSHWTEQ 210 220 230 240 250 SVDYRHKFSL PSVDGQKRYT FRVRSRFPNPL CGSAQHWSW SHPIHWGSNT 260 270 280 290 300 SKENPFLFAL EAVVISVSGM GLIISLLCVY FWLERTMPRI PTLKNLEDLV 310 320 330 340 350 TEYHGNFSAW SGVSKGLAES LQPDYSERLC LVSEIPPKGG ALGEGPGASP 360 CNQHSPLYWAP PCYTLKPET
66	ACP63 scFv Anti-FN CGS-2	mdmrvpaqlgllllwlgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY AMSWVRQAP GKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGVGAFRPYRKHEWGQGLTV/SRggggggggggssSEL TQDPAVSV ALGQTVRIT CQGDSLRSYASWYQQKPGQAPV/LVIYGKNNRPSGIPDRFGSSSGNTASLTITGAQ AEDEADYYCNSSPFEHNLVVFGGGTKLTLVHHHHHEPEA
67	ACP38 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlgllllwlgarcaptsskktqlqlhllldlqmilginnynknpktrmltfkymppkatekhkqlceekpl eevlnlaqsknfhlprrdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefnrwiifqsiittSGGPGPAGMKGLPGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYT YSPDITVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNWDALDYWGQGT VTVSSGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQNVGTNVGWY QQKPGKAPKALYSAFRRYSGVPSRFSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYYTY PYTFGGGTKVEIKggggggggggssEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSSggggggggggssQVQLQESGGGLVQAGGSLRL SCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELYARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTV YLQMNSLKPEDTGVVYCNALYGTDYWGKGTVTVSSHHHHHH

[illegible]

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
72	ACP43 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlgllllwlrngarcaptsstkkktqlqlehlldlqmilingnnyknpltrmltrfkfymppkateklhlqceelkpl eevlnlaqsknfhlprdlisninivilelgsettfmceyadetativelfnrwifcqsistltSGGPGPAGMKGLPGSg ggsgggsgggsgggsgggsgggscldddppeiphatkamaykegtmInceckrgfrniksgslmictgnsshs swdnqcqtssarnitkqvtpqpeeqrkerkttemqspmqpvdaqslpgchrepppweneateriyhfvgqmvyvqvqg yrallrngaesvckmthgktrwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegpesetclvtttidfiqtetnaatmetisiftteyqg ggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVPQGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGTLVTVSSHHHHHH
73	ACP44 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlgllllwlrngarcaptsstkkktqlqlehlldlqmilingnnyknpltrmltrfkfymppkateklhlqceelkpl eevlnlaqsknfhlprdlisninivilelgsettfmceyadetativelfnrwifcqsistltSGGPGPAGMKGLPGSg ggsgggsgggsgggsgggsgggscldddppeiphatkamaykegtmInceckrgfrniksgslmictgnsshs swdnqcqtssarnitkqvtpqpeeqrkerkttemqspmqpvdaqslpgchrepppweneateriyhfvgqmvyvqvqg yrallrngaesvckmthgktrwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegpesetclvtttidfiqtetnaatmetisiftteyqS GGPGAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVPQGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGGRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
74	ACP45 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlgllllwlrngareEVLVESGGGLVPQGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGGRDITLYAESVKGRFTISRDNAKTTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSVSSQGTLVTVSSSGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVPQGSRLSCAAS GFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAADSSSYTSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDSDNWDALDYWGQGTTTVTSVGSGSGSGSGSGSGSDIQ MTQSPSSLASVGDRTITTCASQNVGTNWGYQQPGKAPKALIYSASFYSGVPS RFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYTYTPYTFGGGTKVEIK ^{ggsgsgsgsgsgsgs} ^{ggsgsgsgsgsgsgs} GGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlldlqmilingnnyknpltrmltrfkfympp kkateklhlqceelkpleevlnlaqsknfhlprdlisninivilelgsettfmceyadetativelfnrwifcqsistltHHHHH HH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
75	ACP46 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptsstskktqlqlehlldlqmilinginnyknpkltmrnlrfkfympkkateklhlqcleeekpl eevlnlaqsknfhlpdrdlisninvivlelkgsctfmceyadativeflnrwtfccsiistitSGGPGPAGMKGLPGSg ggsgggsgggsgggsgggsgggsgggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYTLAW VRQAPGKGLEWVAADSSSYTYSPDTRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAV YYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSsgpgpagmkglpgsDIQMTQSPSSLASVGD RV TTTCASQNVTNVGWYQQKPKAPK ALIYSASFYSGVPSRFGSGSDFTLTISS LPEDFATYYCQYYTYPTFTGGGTKVEIKggsgggsgggsgggEVQLVESGGGLVQP G NSLR LSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLLTVTVSSggsgggsgggsggg sQVQ LQESGGGLVQAGGSRLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDD SVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTG VYYCNALYGT DYWGKGTQVTVSSH H HHHH
76	ACP47 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSRLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDS VKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTG VYYCNAL YGT DYWGKGTQVTVTVSSggsgggsgggsgggsgaptssktktqlqlehlldlqmilinginnyknpkltmrnlrfkfy mpkkateklhlqcleeekpleevlnlaqsknfhlpdrdlisninvivlelkgsctfmceyadativeflnrwtfccsiistitSG GPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWRQAPG K GLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG G SLSVSSQGTLVT TVSSggsgggsgggsgggsgggsgggEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSTYTLAWVRQAPGKGLEWVAADSSSYTYSPDTRGRFTISRDN AKNS LYLQMNSLR AEDTAVYYCARD SNWDALDYWGQGTTVTVTVSSGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASQNVGTNWGYQQKPGKAPKALIYSASF RYS GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQYYTYPTFTGGGTKVEIKHHHHH H

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
77	ACP48 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgrcaptssstkkttqlqllehlldlqmilnginnyknpkltmrltrfkfymppkkatelkhlqleelkpl ceevlnlaqsknfhlprdlisininvivlelkgsettfmceyadetativefnlnrvitfcqisistlsGGPGPAGMKGLPGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYVTLAWVRQAPGKGLEWVAADSSSYT YSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDSNWDALDYWGQGT VTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITICKASQNVGTNVGWY QKPGKAPKALYASFRYSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYVCQQYYTY PYTFGGGTKEIKggggsgggsgggsgggEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQAPKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPE DTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
78	ACP49 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgrcaptssstkkttqlqllehlldlqmilnginnyknpkltmrltrfkfymppkkatelkhlqleelkpl ceevlnlaqsknfhlprdlisininvivlelkgsettfmceyadetativefnlnrvitfcqisistlsGGPGPAGMKGLPGSg ggsgggsgggsgggsgggsgggsgggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYVTLAW VRQAPGKGLEWVAADSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASV GDRVITICKASQNVGTNVGWYQKPGKAPKALYASFRYSGVPSRFSGSGGTDFT LTISLQPEDFATYVCQQYYTYPYTFGGGTKEIKggggsgggsgggsgggEVQLVESGGGL VQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
79	ACP92 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgrarcEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTI GGSLSVSSQGTLVTVSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkkttqlqllehlldlqmilnginnyknpkltm lrfkfymppkkatelkhlqleelkplceevlnlaqsknfhlprdlisininvivlelkgsettfmceyadetativefnlnrvitfcqis stlsGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ APKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYC TIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
80	ACP93 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglgllllwlgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTGYYVCNAL YGTDYWGKGQTQVTVSSgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNNS LRPETA VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgsgsgsgsgsgsQVQLQESGGGLVQAGG SLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNLSLKPEDTGYYVCNALYGTDYWGKGQTQVTVSSgsgsgsgsgsgsEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTSPD TVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNSWDALDYWGQGTITVTS SGGGSGGGSGGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQNVGTVNGWYQQKP GKAPKALYSAFRYSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYTYPYTF GGGTKVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptsstktktqlqlehlldlqmlnginnyknpltrmltfkfympkka telkhlqleeeekpleevlnlaqsknfhprdlisminvivlekgsettfmceyadetativeflnrwifcqsiustltHHHHHH
81	ACP94 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglgllllwlgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTGYYVCNAL YGTDYWGKGQTQVTVSSgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNNS LRPETA VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTSPD TVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNSWDALDYWGQGTITVTVSSGGSGGGGGG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQNVGTVNGWYQQKPGKAPKALYSA SFYSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYTYPYTFGGGKVEIKSG GPGPAGMKGLPGSaptsstktktqlqlehlldlqmlnginnyknpltrmltfkfympkkaelkhlqleeeekplee vlnlaqsknfhprdlisminvivlekgsettfmceyadetativeflnrwifcqsiustltHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
82	ACP95 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNAL YGTDYWGKGTQVTVSSggsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNS LRPETA VYYCTIGGSLVSSQGTLVTVSSGGPGPAGMKGLPGSaptsstktqlqlehlldl qmilinginyknpktrmltrfkfymppkkateikhlqcleelkpleevlnlaqsknfhrlprdlisninvivlelkgsettfmceya detativeflnrwifcqsisttHHHHHH
83	ACP96 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNAL YGTDYWGKGTQVTVSSGGPGPAGMKGLPGSaptsstktqlqlehlldlqmilinginyknpktr mltrfkfymppkkateikhlqcleelkpleevlnlaqsknfhrlprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqs isttSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPETA VYY CTIGGSLVSSQGTLVTVSSHHHHHH
84	ACP97 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNAL YGTDYWGKGTQVTVSSggsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNS LRPETA VYYCTIGGSLVSSQGTLVTVSSGGPGPAGMKGLPGSaptsstktqlqlehlldl qmilinginyknpktrmltrfkfymppkkateikhlqcleelkpleevlnlaqsknfhrlprdlisninvivlelkgsettfmceya detativeflnrwifcqsisttSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPETA VYYCTIGGSLVSSQGTLVTVSSHHHHHH
85	ACP99 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNAL YGTDYWGKGTQVTVSSggsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF mpkkateikhlqcleelkpleevlnlaqsknfhrlprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqsisttSG GPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPETA VYYCTIGG SLVSSQGTLVTVSSHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
86	ACP 100 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlrgrarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTGVYYCNAL YGTDYWGKGTVTVSSggggggsgggsggsaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpktrmltfkfy mpkkatelkhlqleeeekpleevlnlaqsknfhlnprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqsistltHH HHHH
87	ACP101 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlrgrarcaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpktrmltfkfympkkatelkhlqleeeekpl eevlnlaqsknfhlnprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqsistltSGGPGPAGMKGLPGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSSQGTLVTVSS HHHHHH
88	ACP 102 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlrgrarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTGVYYCNAL YGTDYWGKGTVTVSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpktr mltfkfympkkatelkhlqleeeekpleevlnlaqsknfhlnprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqs istltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYY CTIGGSLSVSSQGTTLVTVSSggggggsgggsggsEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSPDTRGRFTISR NAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNWDALDYWGQGTITVSSGGGSGGGG SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNVGWYQOKPGKAPKALYS ASFYSGVPSRFSGGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYTYPTYTFGGGKVEIKH HHHHH
89	ACP 103 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlrgrarcaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpktrmltfkfympkkatelkhlqleeeekpl eevlnlaqsknfhlnprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqsistltSGGPGPAGMKGLPGSg ggsgggsgggsgggsggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAW VRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSPDTRGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAV YYCARDNWDALDYWGQGTITVSSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTTCKASQNVGTNVGWYQOKPGKAPKALYSASFYSGVPSRFSGGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQYYTYPTYTFGGGKVEIKggggsgggsgggsggsEVQLVESGGGL VQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLVTVSSggggsgggsggs gsQVQLQESGGGLAQAGGSLRLSCAASGFTVSNVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVG STNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCNRNFDRIYWGQGTQV TVSSHHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
90	ACP 104 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglhllwlgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNVMAWYRQTP GKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNR NFDRIYWGGTQVTVSSaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpltrmltrfkfymppkkatelkhlqleee lkpleevlnlaqsknfhprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefnrwtfcqsiisthSGGPGPAGMKGLP GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDITLYAESVKGRFTISRDNKTTILYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLY TVSSggggsgggsgggsgggsgggsgggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSPDITVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYSAFRTYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYTYPYTFGGGTKEIKHHHHHH
91	ACP 105 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglhllwlgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPG KGLEWVAIDSSSYTYSPDITVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD SNWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYSAFRTYSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQ PEDFATYYCQYYTYPYTFGGGTKEIKggggsgggsgggsgggsgggsgggSGGPGPA GMKGLPGSaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpltrmltrfkfymppkkatelkhlqleeelekpleevlnlaqsk nfhprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefnrwtfcqsiisthSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNKTTILYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLYTVSSggggsggg ggsgggsgggQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNVMAWYRQTPGKQREFVAI INSVGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQ GTQVTVSSHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
92	ACP106 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMMAWYRQTP GKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNR NFDRIYWGGQTQVTVSSggggsgggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTF SKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNS LRPETA VY YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTSPD TVRGRFTI SRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCARD SNWDALDYWGQGT TVTVSSGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKAL IYSASFYSYSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYTYPYTFGGGGTKVEI KggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggSGGGPGAPMKGLPGSaptssstktqlqlhllldlqmilnginn yknpltrmltrfkfympkkatelkhleeeelpleevlnlaqsknfhlprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefln rwitfcqsiistltHHHHHH
93	ACP 107 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPG KGLEWVAIDSSSYTSPD TVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARD SNWDALDYWGQGT TVTVSSGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKAL IYSAFYSYSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQYYTYPYTFGGGGTKVEIKggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggEVQLVES GGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGPGP AGMKGLPGSaptssstktqlqlhllldlqmilnginn yknpltrmltrfkfympkkatelkhleeeelpleevlnlaq sknfhlprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwifcqsistltHHHHHH LAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGGQTQVTVSSHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
94	ACP108 proteína de fusión de IL-2	m d m r v p a q l l g l l l w l r g a r c Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G R I F S I D I M S W Y R Q A P G K Q R E L V A R I T R G G T I S Y D D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T G V Y Y C N A L Y G T D Y W G K G T Q V / T V S S g g s g g s g g s g s s t k k t q l e h l l d l q m i n g i n n y k n p k l t r m l f t k f y m p k k a t e l k h l q c e e l k p l e e v l n l a q s k n f h l p r d l i s n u r v i l e l k g s e t f m c e y a d e t a t i v e f l n r w t f c q s i t l t S G G P G A G M K G L P G S r g e t g p a a P G S E V Q L V E S G G G L V Q P G N S L R L S C A A S G F T S K F G M S W V R Q A P G K G L E W V S S I S G S R D T L Y A E S V K G R F T I S R D N A K T T L Y L Q M N S L R P E D T A V Y Y C T I G G S L S V S S Q G T L V T V S S g g s g g s g g s g g s g g s g g s g g s E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T S S Y T L A W V R Q A P G K G L E W V A A I D S S Y T Y S P D T V R G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y C A R D S N W D A L D Y W G Q G T T V T V S S G G G S G G G S G G G S D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C A S Q N V G T N V G W Y Q Q K P G K A P K A L I Y S A S F R Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Y Y T Y P Y T F G G G T K V E I K H H H H H
95	ACP 117 scFv Anti-FN CGS-2	m d m r v p a q l l g l l l w l r g a r c E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G V G A F R P Y R K H E W G Q G T L V T V S R e g g s g g s g g s g g s S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F S G S S S G N T A S L T T T G A Q A E D E A D Y Y C N S S P F E H N L V V F G G G T K L T V L H H H H H H E P A
96	ACP118 NARA1 Vh/Vl no escindible	m d m r v p a q l l g l l l w l r g a r c Q V Q L Q Q S G A E L V R P G T S V K V S C K A S G Y A F T N Y L I E W V K Q R P G Q G L E W I G V I N P G S G G T N Y N E K F K G K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R W R G D G Y Y A Y F D V W G A G T T V T V S S g g s g g s g g s g g s D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y M N W Y Q Q K P G Q P P K L I Y A A S N L E S G I P A R F S G S G T D F T L N I H P V E E D A A T Y Y C Q Q S N E D P Y T F G G G T K L E I K H H H H H H E P A
97	ACP 119 NARA1 Vh/Vl escindible	m d m r v p a q l l g l l l w l r g a r c Q V Q L Q Q S G A E L V R P G T S V K V S C K A S G Y A F T N Y L I E W V K Q R P G Q G L E W I G V I N P G S G G T N Y N E K F K G K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R W R G D G Y Y A Y F D V W G A G T T V T V S S G G G P G A M K G L P G S D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y M N W Y Q Q K P G Q P P K L I Y A A S N L E S I P A R F S G S G T D F T L N I H P V E E D A A T Y Y C Q Q S N E D P Y T F G G G T K L E I K H H H H H H E P A

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
98	ACP120 NARA1 VIVh no escindible	mdmrvpaqlglglllwlgarcDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDSYMWNWYQ QKPGQPPKLLIYAASNLESIGIPARFSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAITYYCCQSNEDP YTFGGGTKLEIKggggsgggsgggQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLI EWVKQRPQGQLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSD SAVYFCARWRGDGYAYFDVWGAGTTVTVSSHHHHHHEPEA
99	ACP121 NARA1 VIVh escindible	mdmrvpaqlglglllwlgarcDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDSYMWNWYQ QKPGQPPKLLIYAASNLESIGIPARFSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAITYYCCQSNEDP YTFGGGTKLEIKSGGPGPAGMKGLPGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAF TNYLIEWVKQRPQGQLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSDDSA VYFCARWRGDGYAYFDVWGAGTTVTVSSHHHHHHEPEA
100	ACP 124 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglglllwlgarcaptssstktqlqlhllldlqmlinginnynkpktrmltfkfympkkateklhlqleelkpl eevlnlaqsknfhlprrdlisinnvivilekgsctffmceyadetativefnnrwtifqsiistlfgggsgggsgggsEVQLV ESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYA ESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHH HHEPEA
101	ACP 132 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglglllwlgarcaptssstktqlqlhllldlqmlinginnynkpktrmltfkfympkkateklhlqleelkpl eevlnlaqsknfhlprrdlisinnvivilekgsctffmceyadetativefnnrwtifqsiistlfgggsgggsgggsdskhsev ahrfdlgeenfkalvliafaqylqqpfedhvklnvevtefaktcvadesaencdkslhifgdklctvatlretygemadccakq epemecfqlhkddnplprlvpevdvmctafhdneetflkkylyciarrhpyfyapellffakrykaafteccqaadkaacllpk ldeIrdegkassakqrikcaslqkfgerafkawavarlsqrfpkafaevsklvtldtkvhtechgdlleccadradrlakvicensq dsissklkeceekpllekshciaevendempadlpslaadfvskdvknyacakdvflgmflfyeyarrhpdysvvlrlaktye ttlekcacaaadphecayakvfdelpveepqnlkqncelfeqlgeyfkqnalrvrytkkvpqvstptlvevsmilgkvsgkckh peakmnpcaedylsvvlnqlvlehtkptvsdrvtkcctesivnrtpcsalevdetyvpkfnaetfthadictlsekerikkqta lvelvkhkpkatkeqlkavmmdfaafveckeckadketctfaeegkklvaasqaalgIHHEHHHHEPEA

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
102	ACP141 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlrgrcaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpkltmrltrkfymppkateklhlqleelkpl eevlnlaqsknfhrlprdlisinivivlelkgsettfmceyadetativefnrwtfcqsiiitlsggpgpAGMKGLPGSd ahrfdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvklnvevtefaktevadesaenodkslhtfgdklctvatlretygema epemecflqhkdndnplprlvpevdvmtafhdneetflkylveiarhpyfyapeliffakrykaafteccqaadkaacllpk ldelrdegkassakqrlkcaslqkfgerafkawavarlsqrpfkaefavsklvtdltkvhcechgdllccaddradlakycienq dsisskileceekpllekshciaevendempadlpslaadfveskdcknyaeakdvflgmflveyarhpdysvlllnlaky ttlekeccaaadphecyakvfdefkplveepqnlkqncelfeqlgeyfkfnallvrytkvpqvstplvevsmgkvgskcekh peakrmpcaedyIsvvlnqlcvlhektpvsdrvtkccteslvnrrpcfsalevdeetyvpkefnaetffhadietlsekerqkkqta lvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekeccaddketctfaeegklvaasqaalgIHHHHHHEPEA
103	ACP 142 proteína de fusión de IL-2	mdmrvpaqlglillwlrgrcaptssstktqlqlhllldlqmilnginnyknpkltmrltrkfymppkateklhlqleelkpl eevlnlaqsknfhrlprdlisinivivlelkgsettfmceyadetativefnrwtfcqsiiitlsggpgpAGMKGLPGSd ahksevahrfdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvklnvevtefaktevadesaenodkslhtfgdklctvatlretygema dceakqepemecflqhkdndnplprlvpevdvmtafhdneetflkylveiarhpyfyapeliffakrykaafteccqaadk aacllpkldelrdegkassakqrlkcaslqkfgerafkawavarlsqrpfkaefavsklvtdltkvhcechgdllccaddradlak ycienqdsisskileceekpllekshciaevendempadlpslaadfveskdcknyaeakdvflgmflveyarhpdysvlllnl rlaktyettlekeccaaadphecyakvfdefkplveepqnlkqncelfeqlgeyfkfnallvrytkvpqvstplvevsmgkvg skcekhpeakrmpcaedyIsvvlnqlcvlhektpvsdrvtkccteslvnrrpcfsalevdeetyvpkefnaetffhadietlseker qikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekeccaddketctfaeegklvaasqaalgIHHHHHHEPEA

(continuación)

[illegible]

72

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
111	ACP153 (Conjugado de IL-2)	mdmrvaqlglllwgarcaptsstktqlqlehlldlqmlinginnynkpltrmltfkfymppkatelkhqldeekple evlnlqsknfhrprdlisininvilekgsettfmceyadativeflnrwifcqiistltsggpGPAGLYAQpgsEVQLVE SGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLVSSSQGTLTVSSggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggpGP AGLYAQpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSP DTVGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDNSWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGG SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYASAFRYSGVPSRFSG GSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYTYPTFGGGTKVEIKHHHHHEPEA
112	ACP 154 (Conjugado de IL-2)	mdmrvaqlglllwgarcaptsstktqlqlehlldlqmlinginnynkpltrmltfkfymppkatelkhqldeekple evlnlqsknfhrprdlisininvilekgsettfmceyadativeflnrwifcqiistltsggpPGGAGLYAQpgsEVQLVE SGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLVSSSQGTLTVSSggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggpGP GPAGLYAQpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSPD TVRGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDNSWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGG GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYASAFRYSGVPSRFSG GSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYTYPTFGGGTKVEIKHHHHHEPEA
113	ACP155 (Conjugado de IL-2)	mdmrvaqlglllwgarcaptsstktqlqlehlldlqmlinginnynkpltrmltfkfymppkatelkhqldeekple evlnlqsknfhrprdlisininvilekgsettfmceyadativeflnrwifcqiistltsggpALFKSFPpgsEVQLVES GGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVVYCTIGGSLVSSSQGTLTVSSggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggpALF KSSFPpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAIDSSSYTYSPDT VRGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDNSWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGG GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALYASAFRYSGVPSRFSG GSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYTYPTFGGGTKVEIKHHHHHEPEA

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
114	ACP156 (Conjugado de IL-2)	mdmrnpaqlglllrlrgarcaptssstktqlqlehlldlqmlnginnynkpnktrmltffkfympkkatelkhlqcleekple evlnlaqsknfhrlprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefnrwtfcqsiistltsggpPLAQKLKSpgsEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGTILVTSSgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggpPL AQKLKSpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTSP DTVRGFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDNWDALDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGG SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQNVGTNVGWYQKPGKAPKALISASFRYSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQYYTYPTYTFGGGTKEIKHHHHHEPEA
115	ACP157 (Conjugado de IL-2)	mdmrnpaqlglllrlrgarcaptssstktqlqlehlldlqmlnginnynkpnktrmltffkfympkkatelkhlqcleekple evlnlaqsknfhrlprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefnrwtfcqsiistltsggpPGGPAGIGalfkssfpPLA QKLKSpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGTILVTSSgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggp sgggsgggsgggpPGGPAGIGalfkssfpPLAQKLKSpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY TLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTSPDTVRGFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDN WDALDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQNVGTNVG WYQKPGKAPKALISASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQYYTYPTYTFGGGTKE IKHHHHHEPEA

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
116	EGFR (G8) Profármaco C1486	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVVRQGGGGGLDGNPEPGGLE WVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN~~AK~~TTLYLQMN~~SL~~RPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGT~~LV~~TVSSGGGKPLGLQARVVGGGGTQTVVTQEP~~SL~~TVSPGGTVTLTCA~~SS~~ GAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLGGKAALTL~~SGVQ~~P EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT~~LV~~T VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE~~F~~ VVAINWASGTTYADSVKGRFTISRDN~~SK~~N~~TL~~YLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAAGYQINS~~GN~~YN FKDYEYDWGQGT~~LV~~TVSSHHHHH
117	EGFR (G8) Profármaco no escindible C1756	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVVRQGGGGGLDGNPEPGGLE WVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN~~AK~~TTLYLQMN~~SL~~RPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGT~~LV~~TVSSGGGSGGGGGVVGGGGTQTVVTQEP~~SL~~TVSPGGTVTLTCA~~SS~~ TGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLGGKAALTL~~SGVQ~~ PEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGT~~LV~~T VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE~~F~~ VVAINWASGTTYADSVKGRFTISRDN~~SK~~N~~TL~~YLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAAGYQINS~~GN~~YN FKDYEYDWGQGT~~LV~~TVSSHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
118	EGFR (G8) Profármaco Activo C1300	YVGGGQTQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLVPCTPARFSGSLGGAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLTSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAINWASGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYGQGTTLVTVSSHHHHHH
119	PSMA Profármaco C1872	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNPEPGGLE WVSSISGGRDITLYADSVKGRFTISRDNNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGTTLVTVSSGGGGKPLGLQARVVGGGGTQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCAST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLGGAALTLSGVQP EDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTTLVT VSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEYHMHVVRQAPGKGLE WVSTINPAGTTIDYAESVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDYSGYRGQTQ VTVSSHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
120	PSMA Profármaco no escindible C1873	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAAGFTFSKFGMSWVRQQGGGGGLDGNPEPPGGLE WVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGTQTVVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASS TGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQ PEDEAEYYCTILWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLLVT VSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEYHMHWWVRQAPGKGLE WVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRGQGQTQ VTVSSHHHHHHH
121	PSMA Profármaco Activo C1875	VVGGGGTQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCAASGTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGL IGGTFKFLVPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCTILWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNKYAINWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLTSCAASRFMISEYHMHWWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRGQGQTQTVTSSHHHHHHH

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
122	GFP TrITAC C646	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWVRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSS YEDSVKGRFTISRDDARNITVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQTQTVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGGRDITLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLTVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWVRQA PGKLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGSGQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
123	TrITAC C1874 no enmascarado/no escindible	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGR DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTV SSGGGGGGGGGGVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCT LWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSLSC AASGFTFNKYAINWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEYHMHVVRQAPGKLEWVSTINP AGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCDSYGYRGQGTQVT VSSHHHHHH
124	Bloqueante 2 (bloqueante de IL2)	mdmrpvaqlgllllwlrgrarceVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTLAWVRQAPGKLEWVAAL DSSSYTSPDITVRGFTISRDNAKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARDNSWDALDYWGQGTITVTVSSggg 85ggg858gg85DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIVASFRYSQVP SRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYTYPTFTGGGKVEIKHHHHH

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión de la fórmula:

[A]-[L1]-[B]-[L2]-[D] o [A]-[L1]-[D]-[L2]-[B] o [D]-[L2]-[B]-[L1]-[A] o
 [B]-[L2]-[D]-[L1]-[A] o [D]-[L1]-[B]-[L1]-[A] o [B]-[L1]-[D]-[L1]-[A]

5

en donde,

A es un polipéptido de interleucina 2 (IL-2);

10 B es un elemento de extensión de la semivida, en donde el elemento de extensión de la semivida es albúmina de suero humano, o un polipéptido de unión a antígeno que se une a la albúmina de suero humano;

15 L1 es un enlazador polipeptídico escindible por proteasa y L2 es un enlazador polipeptídico que es opcionalmente escindible por proteasa, en donde para cada uno de L1 y L2, independientemente, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en una calicreína, trombina, quimasa, carboxipeptidasa A, catepsina G, una elastasa, PR-3, granzima M, una calpaína, una metaloproteinasa de matriz (MMP), un activador de plasminógeno, una catepsina, una caspasa, una triptasa, o una proteasa de la superficie de células tumorales; y;

20 D es un resto de bloqueo de IL-2 en donde el resto de bloqueo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une al polipéptido de IL-2; y

25 en donde el polipéptido de fusión tiene una actividad activadora del receptor de IL-2 atenuada, en donde la actividad activadora del receptor de IL-2 del polipéptido de fusión es al menos aproximadamente 10 veces menor que la actividad activadora del receptor de IL-2 del polipéptido que contiene el polipéptido de IL-2 que se produce por la escisión del enlazador escindible por proteasa L1 o, cuando L2 es escindible por proteasa, mediante la escisión tanto de L1 como de L2, y en donde

30 la actividad activadora del receptor de IL-2 se valora usando un ensayo de proliferación de CTLL-2, un ELISA de fosfo STAT, o un ensayo de células informadoras HEK Blue con cantidades iguales en una base molar del polipéptido de IL-2 y el polipéptido de fusión.

35 2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en donde el resto de bloqueo de IL-2 comprende un anticuerpo de dominio único, Fab o scFv que se une al polipéptido de IL-2.

3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1 o 2, en donde L2 es un enlazador polipeptídico escindible por proteasa.

40 4. El polipéptido de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido escindible por proteasa comprende independientemente dos o más sitios de escisión para la misma proteasa, o dos o más sitios de escisión que se escinden por proteasas diferentes o al menos uno de los polipéptidos escindibles por proteasas (L1 o L2 o ambos) comprende un sitio de escisión para dos o más proteasas diferentes.

45 5. El polipéptido de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde la catepsina es catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina K o catepsina L.

6. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la metaloproteasa de matriz (MMP) es MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, o MMP14.

50 7. El polipéptido de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde el resto de bloqueo de IL-2 se une de forma no covalente al polipéptido de IL-2.

8. El polipéptido de fusión de la reivindicación 7, en donde la unión no covalente es dependiente del pH.

55 9. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de cualquier reivindicación anterior.

10. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.

60 11. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 10.

12. Un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 11 en condiciones adecuadas para la expresión y recogida de los polipéptidos deseados.

13. Una composición farmacéutica que comprende i) una cantidad efectiva del polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Un polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica de la reivindicación 13 para uso como un medicamento.
- 5

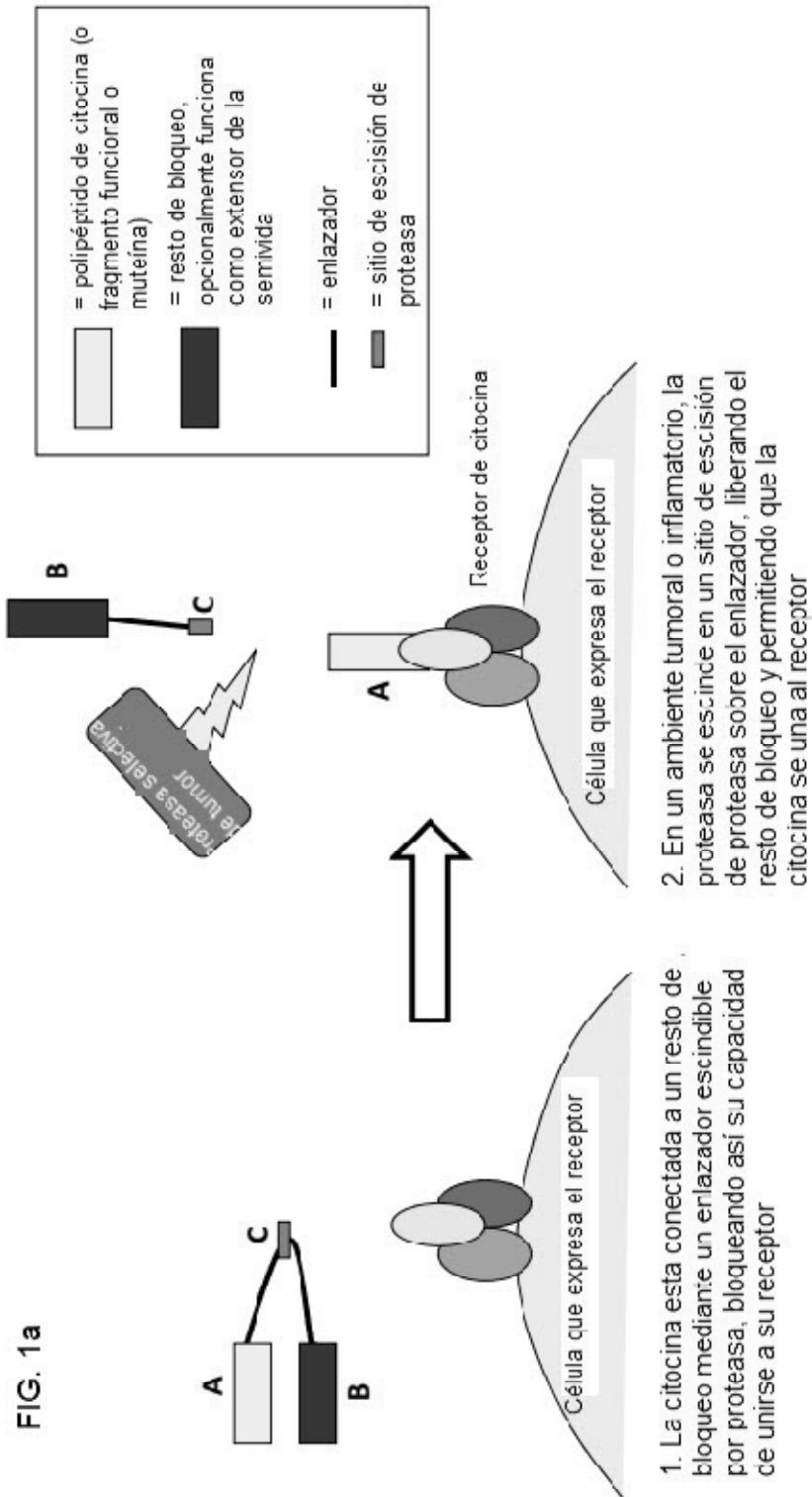


FIG. 1b: HSA unida directamente

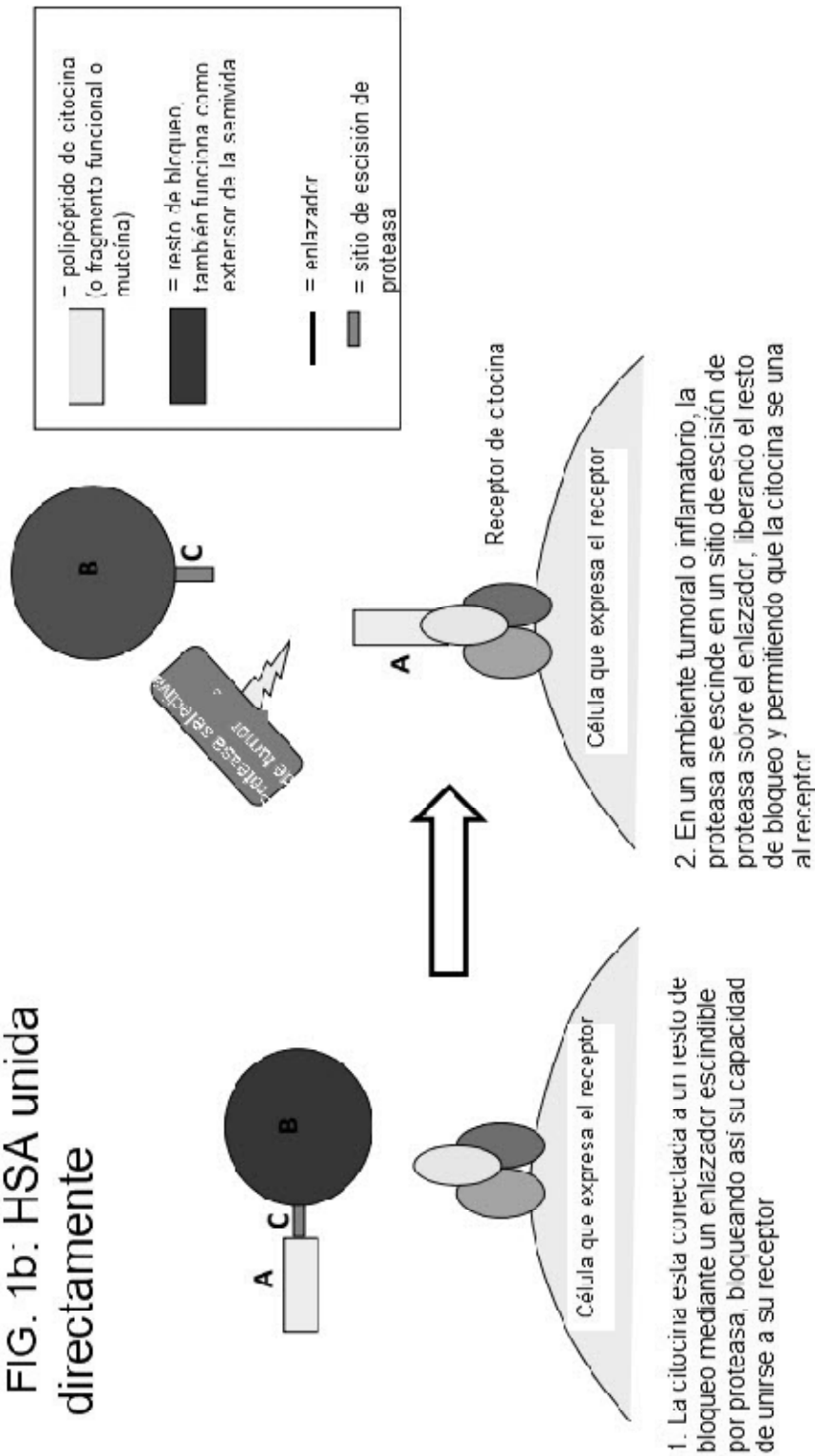


FIG. 1c: HSA múltiple unida
directamente

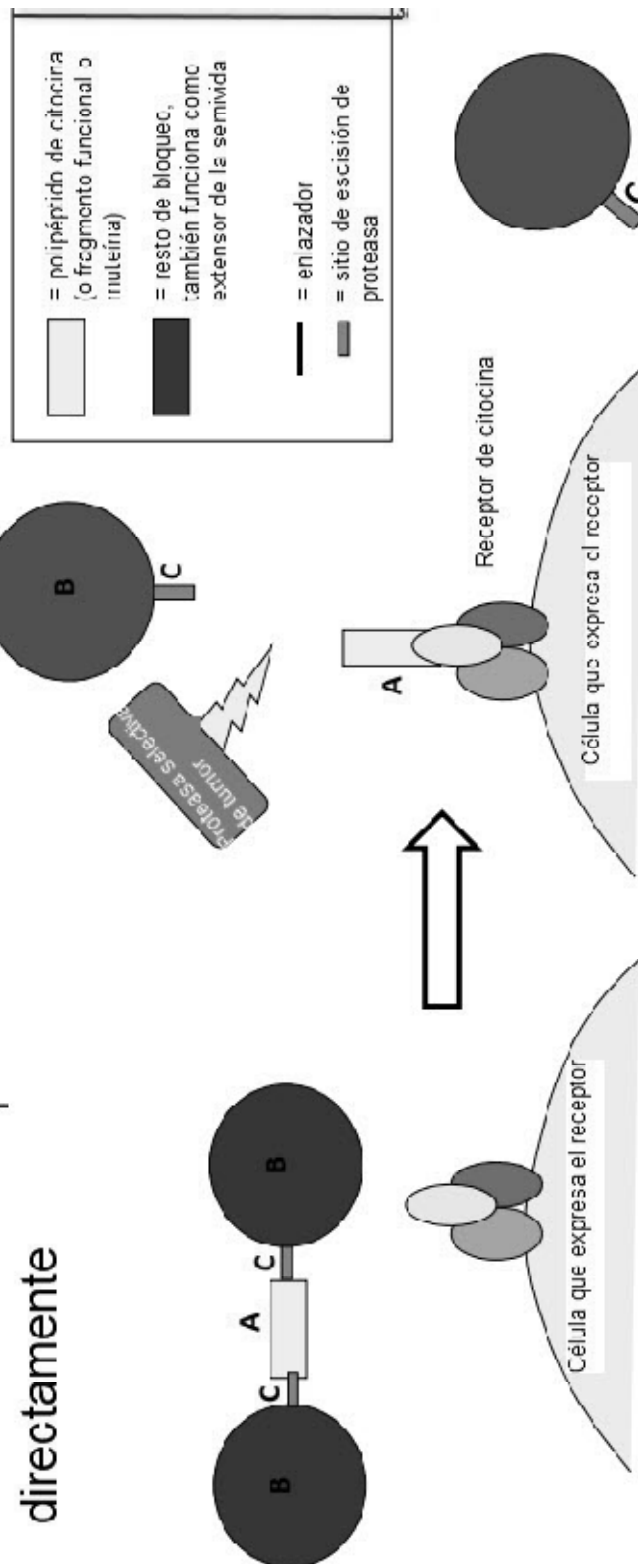
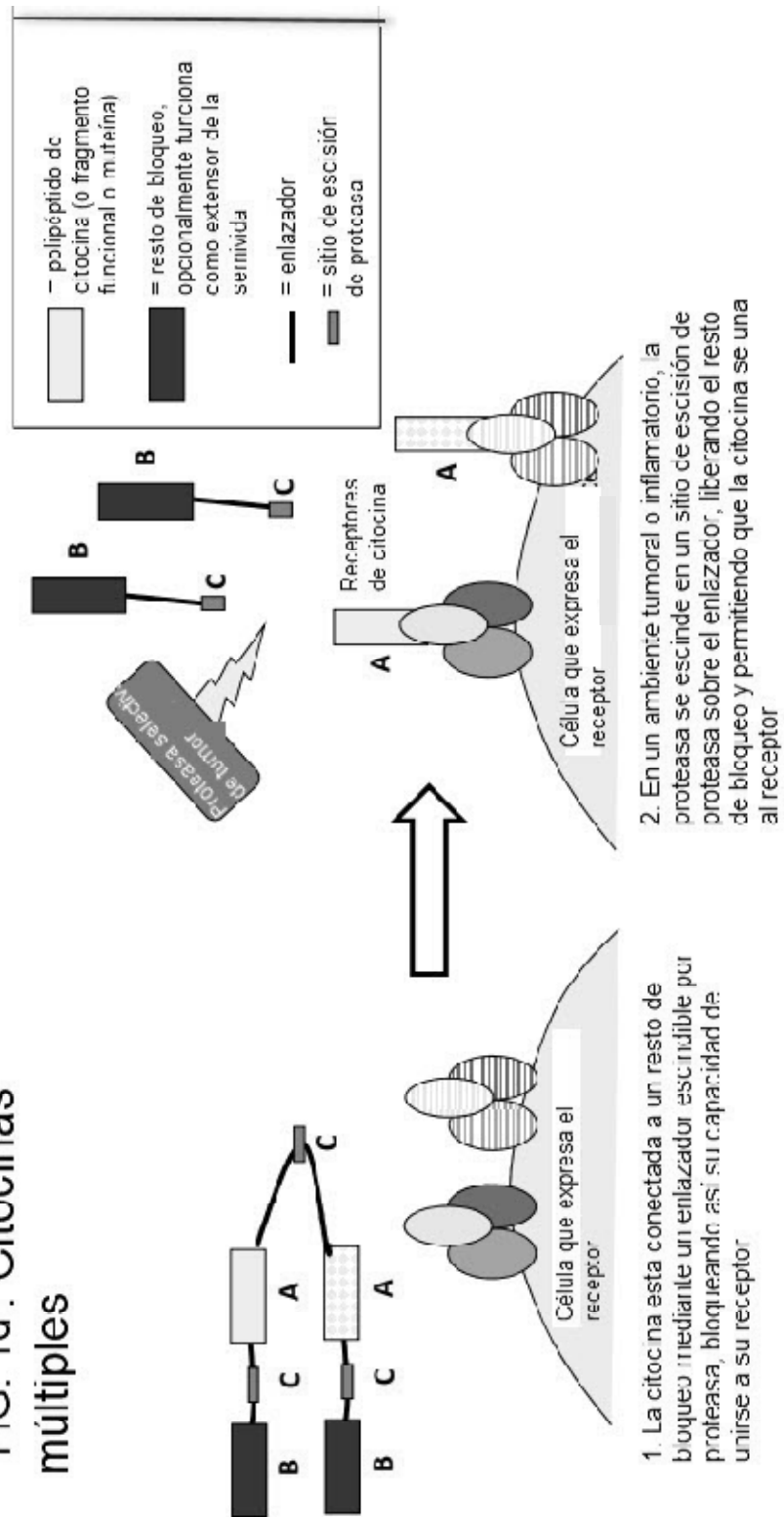
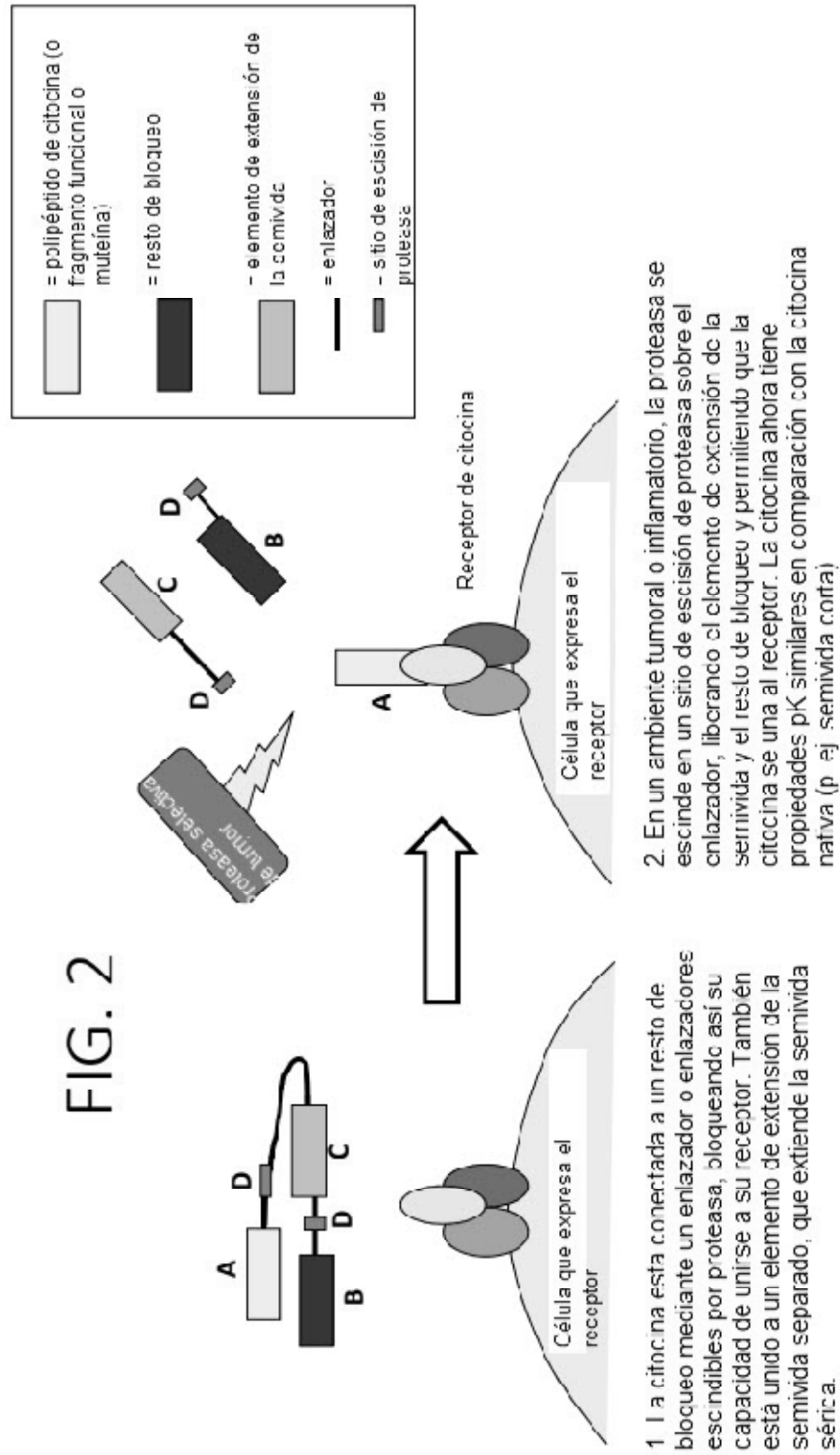


FIG. 1d : Citocinas múltiples





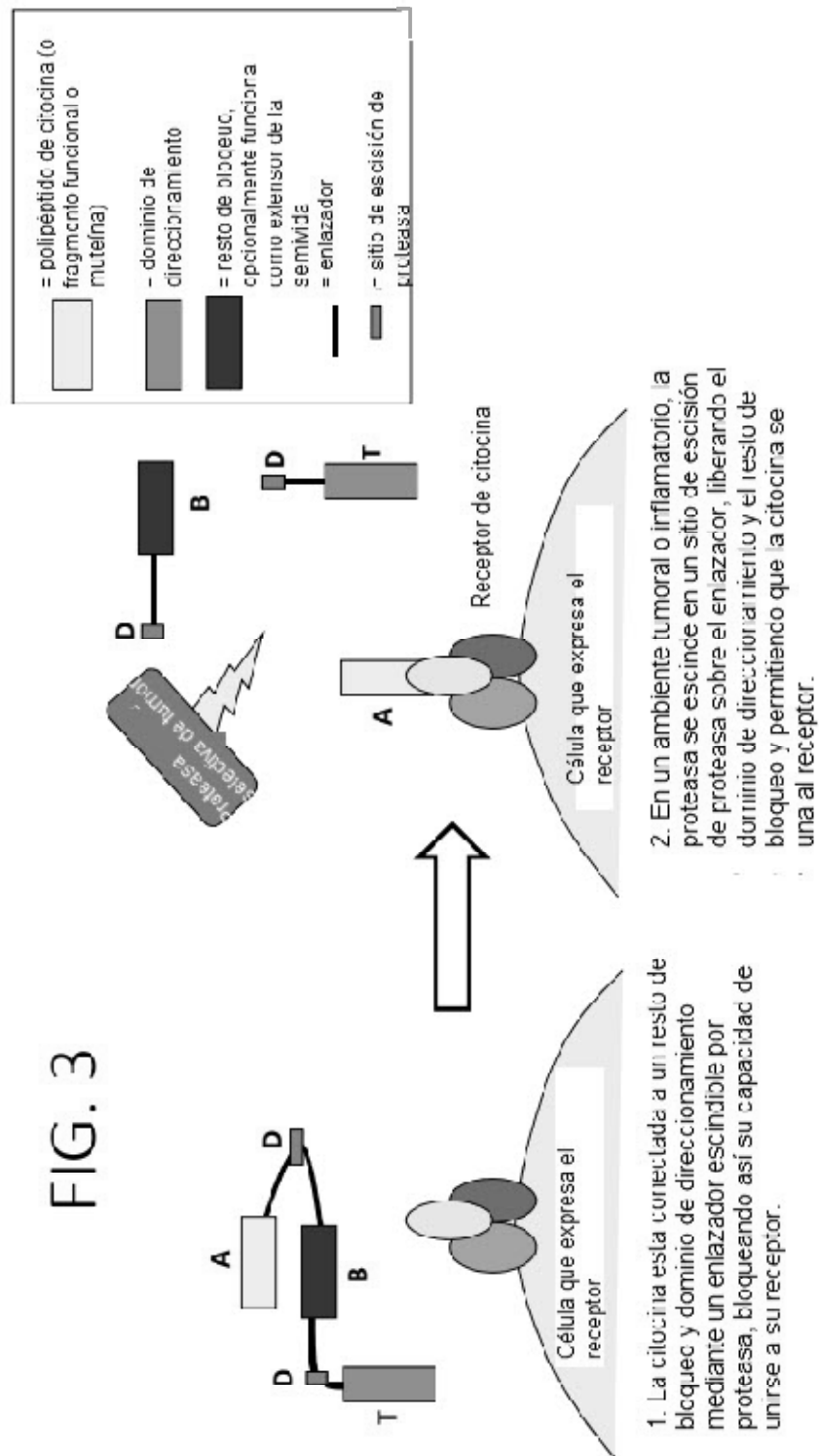
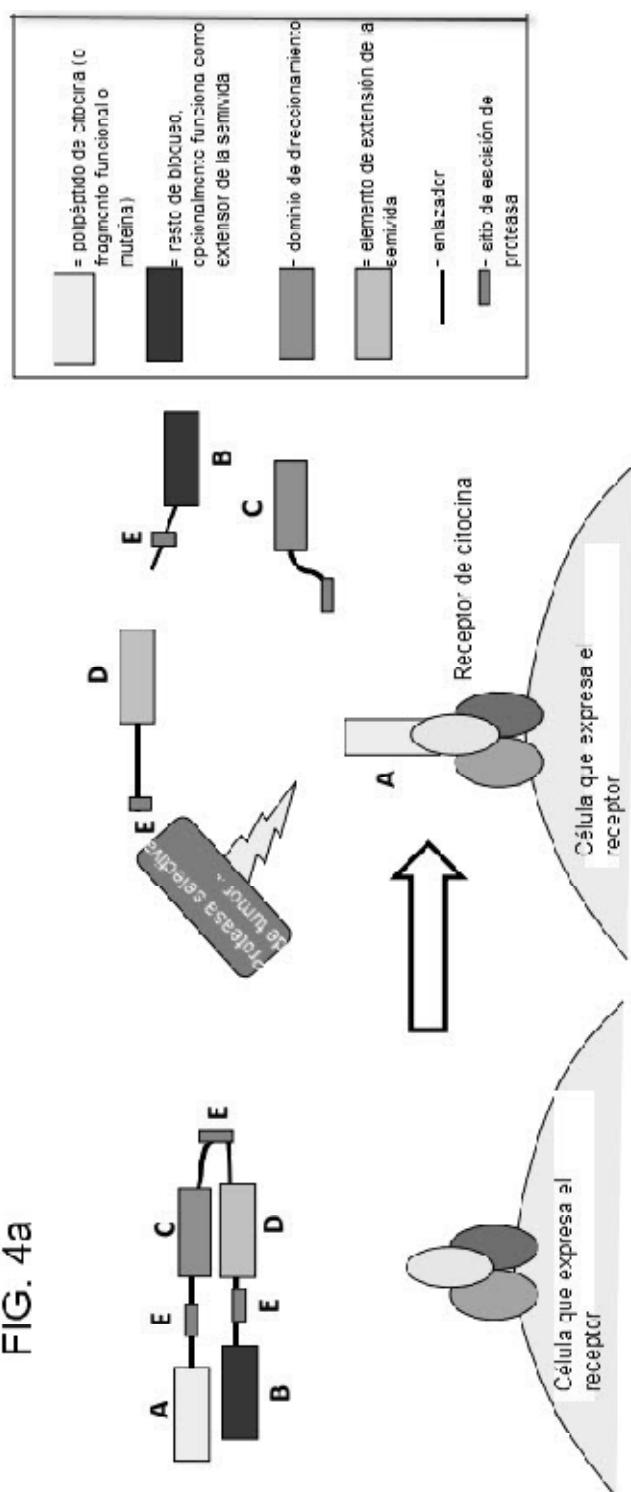


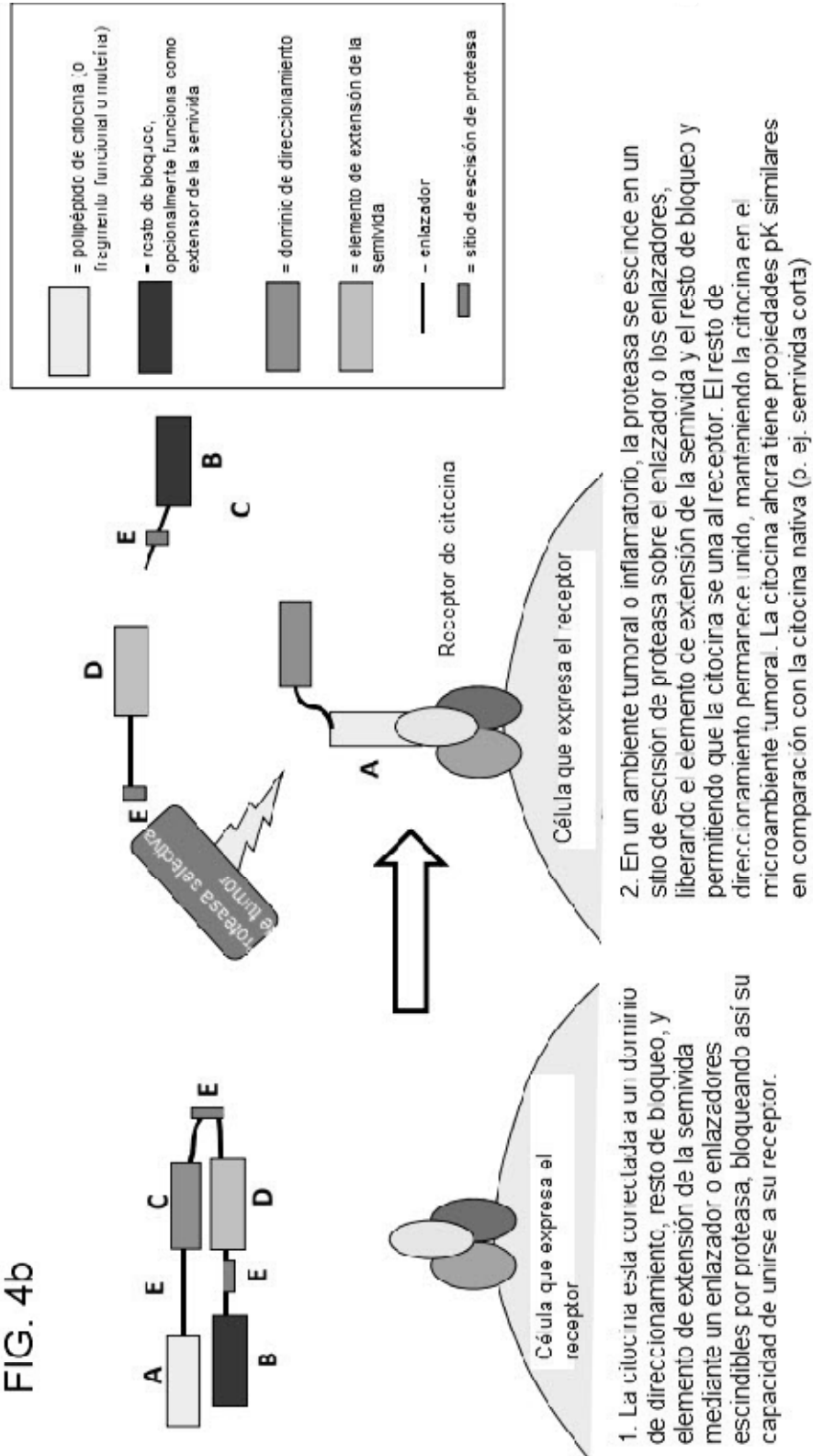
FIG. 4a



2. En un ambiente tumoral o inflamatorio, la proteasa se escinde en un sitio de escisión de proteasa sobre el enlaceador o los enlaces, liberando el elemento de extensión de la semivida, el dominio de direccionamiento y el resto de bloqueo y permitiendo que la citocina se una al receptor. La citocina ahora tiene propiedades de PK similares en comparación con la citocina nativa (p. ej. semivida corta)

1. La citocina está conectada a un dominio de direccionamiento, resto de bloqueo, y elemento de extensión de la semivida mediante un enlaceador o enlaces escindibles por proteasa, bloqueando así su capacidad de unirse a su receptor.

FIG. 4b



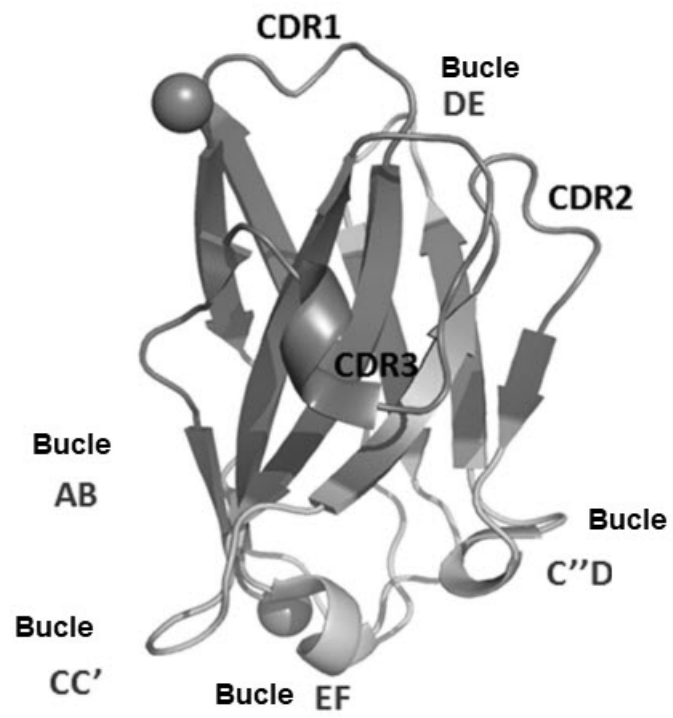


FIG. 5

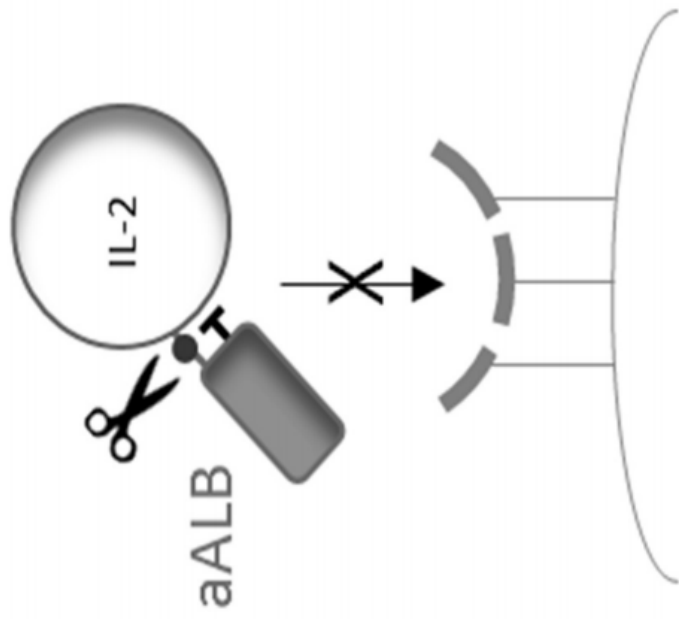


FIG. 6

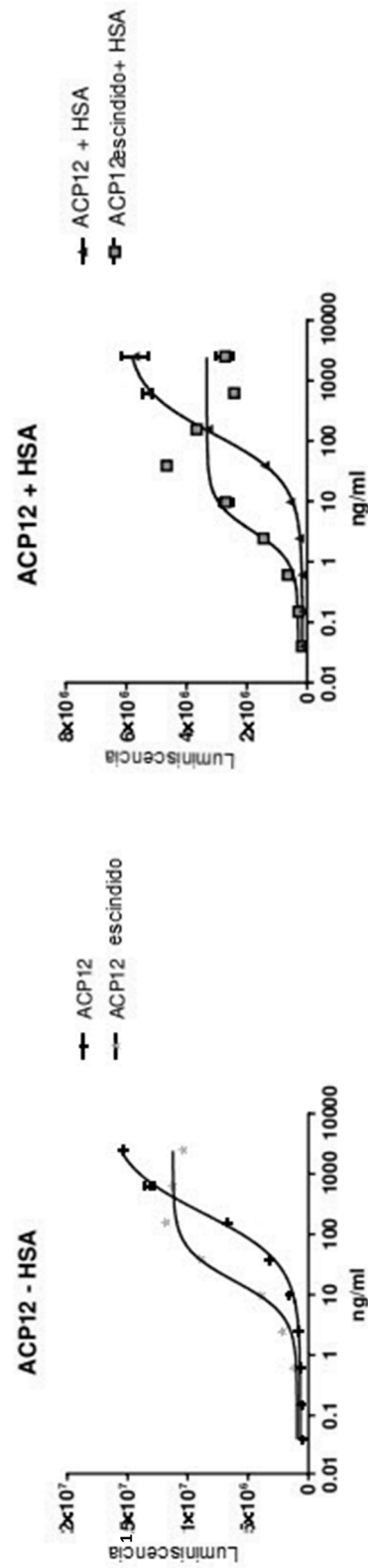


FIG. 7a

FIG. 7b

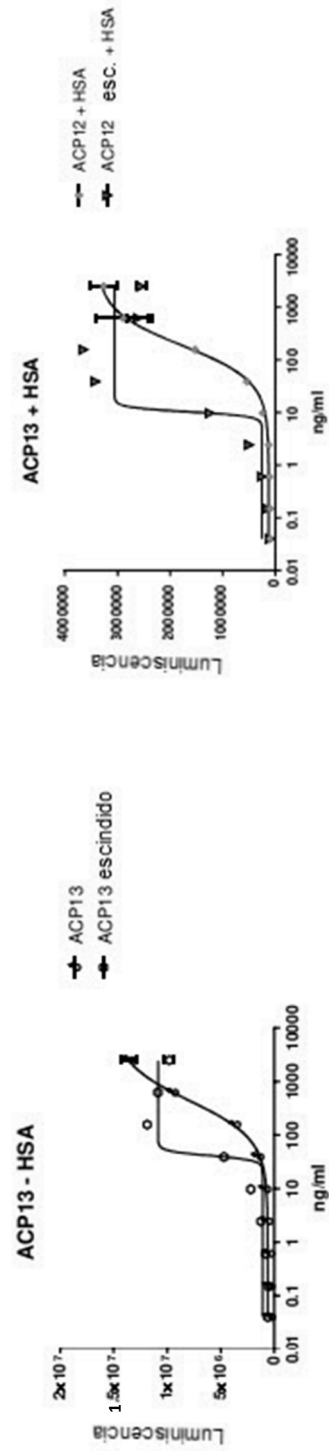


FIG. 7c

FIG. 7d

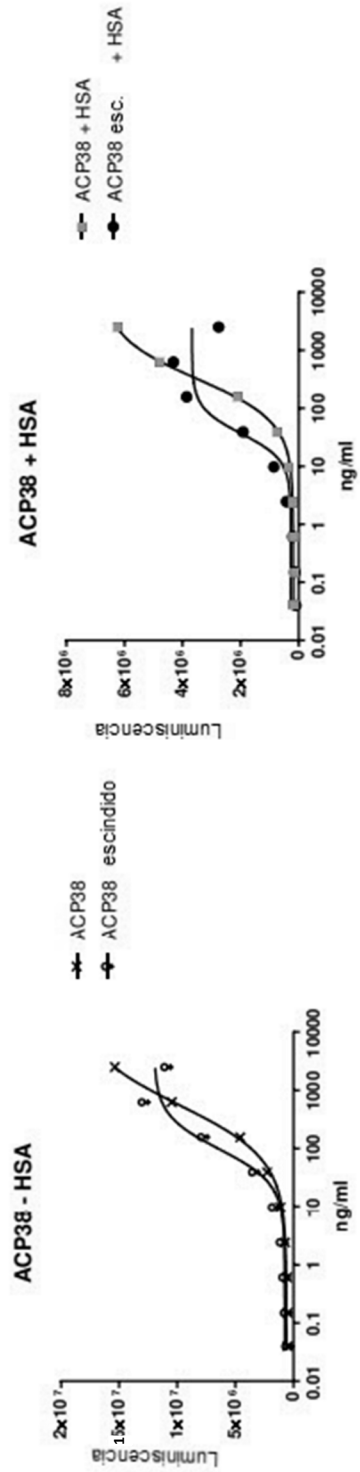


FIG. 7e

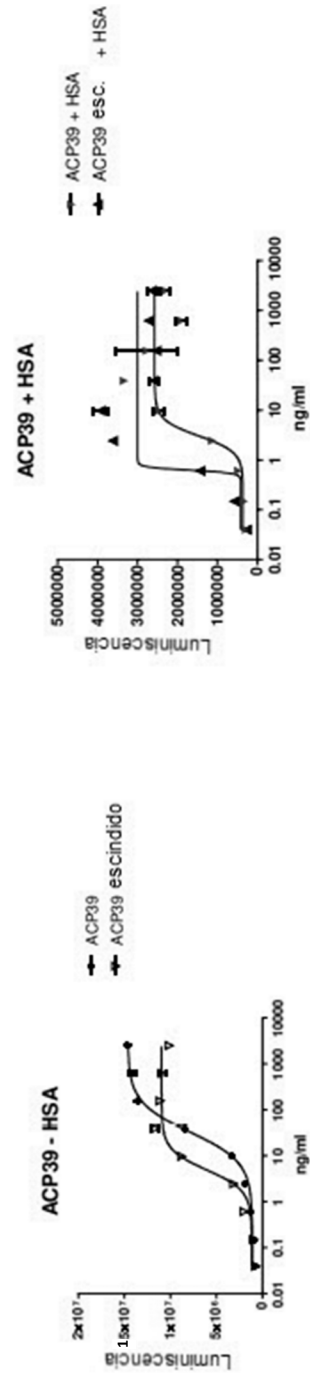


FIG. 7g

FIG. 7f

FIG. 7h

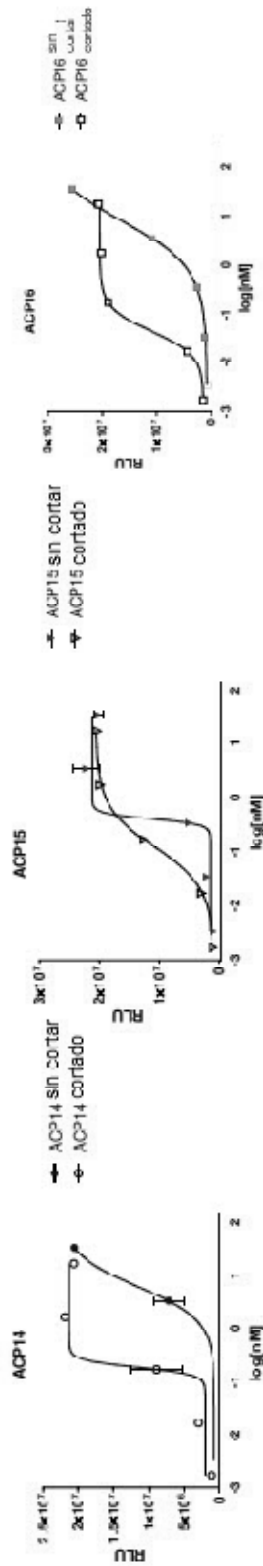


FIG. 8a

FIG. 8b

FIG. 8c

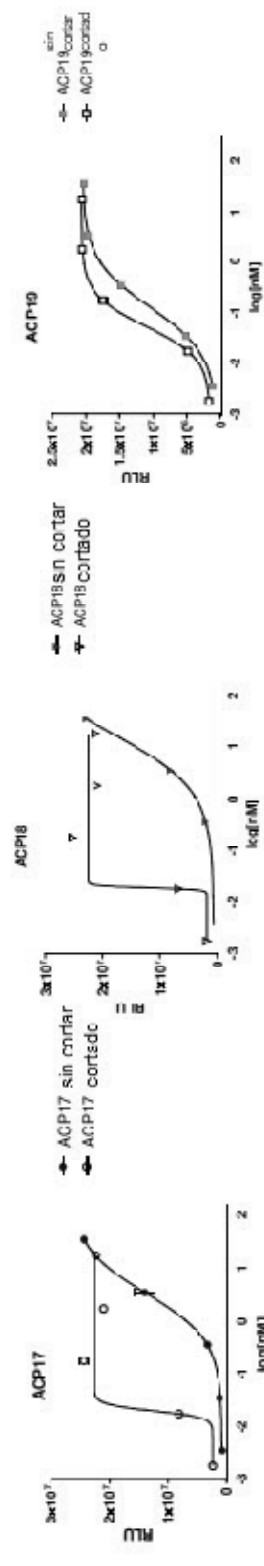


FIG. 8d

FIG. 8e

FIG. 8f

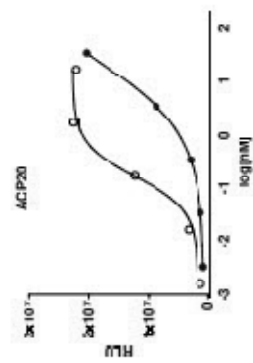


FIG. 9a

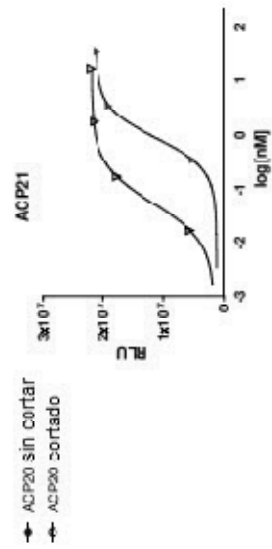


FIG. 9b

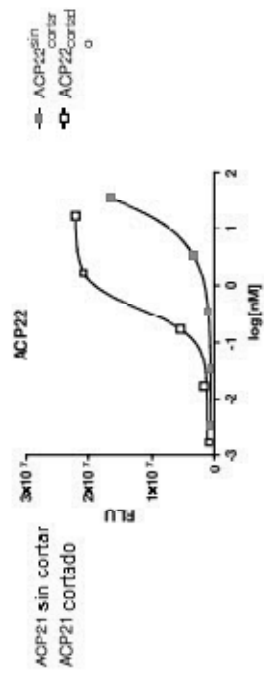


FIG. 9c

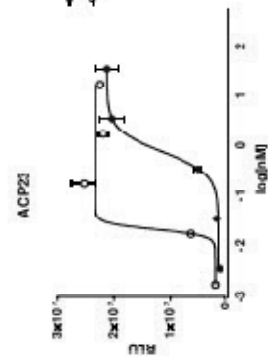


FIG. 9d

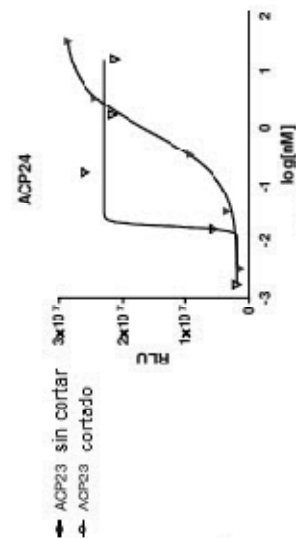


FIG. 9e

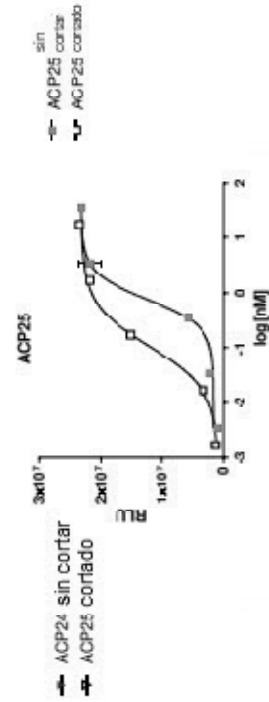
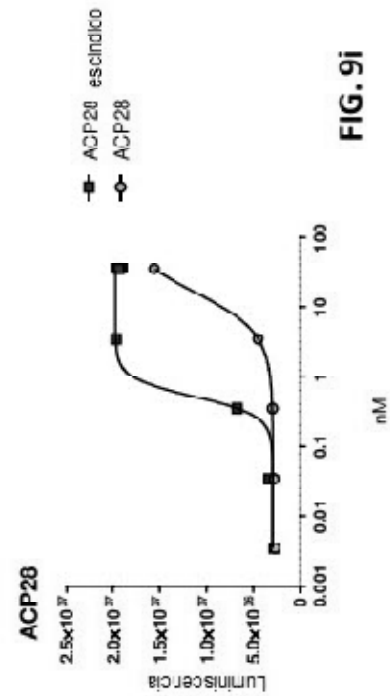
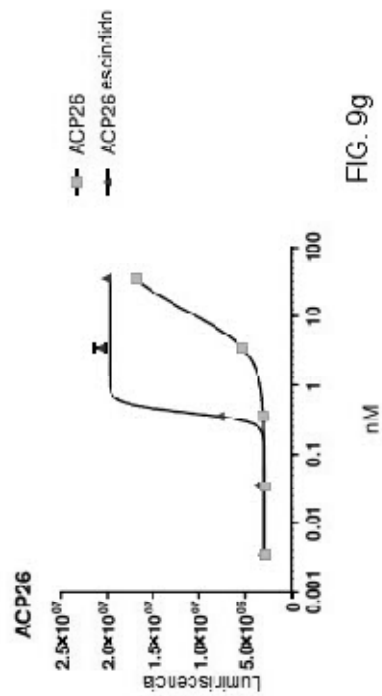
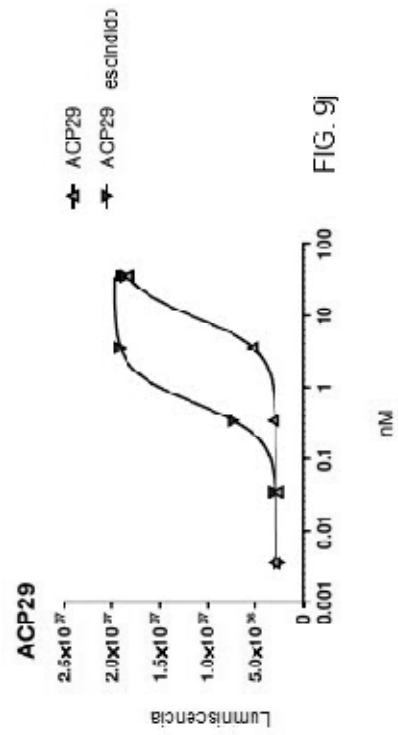
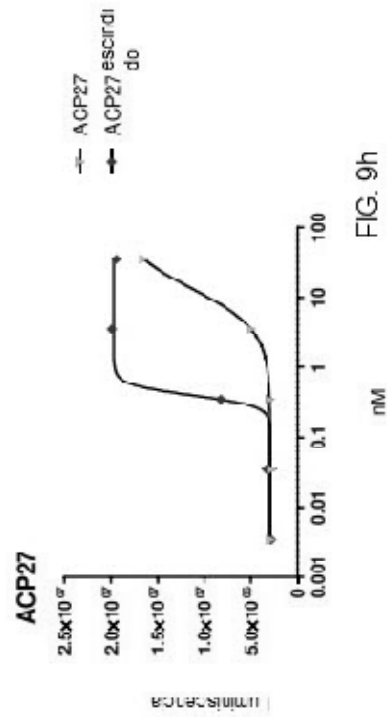


FIG. 9f



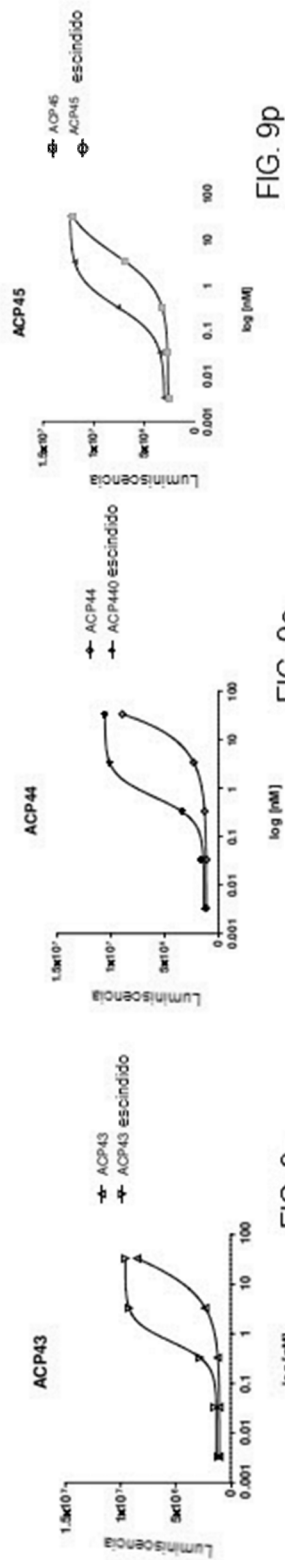
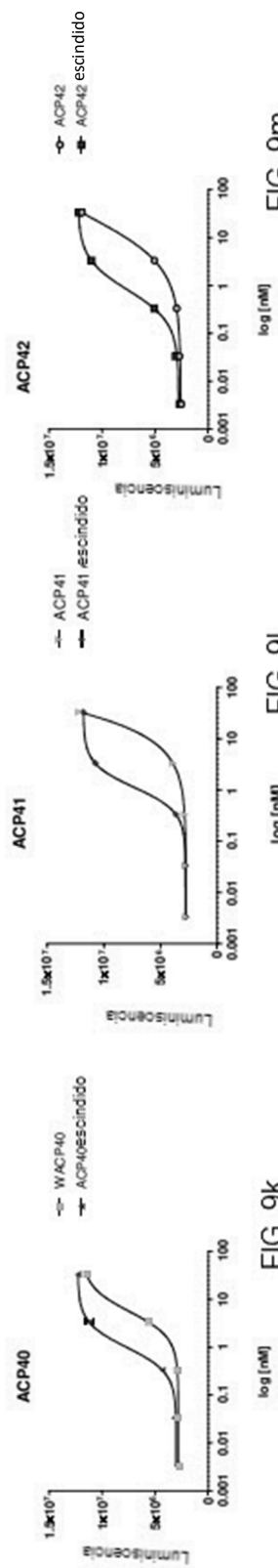
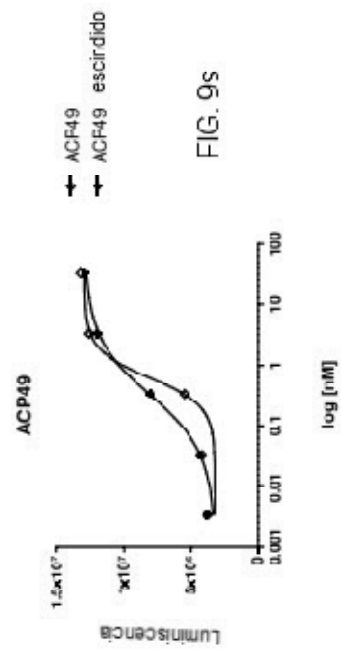
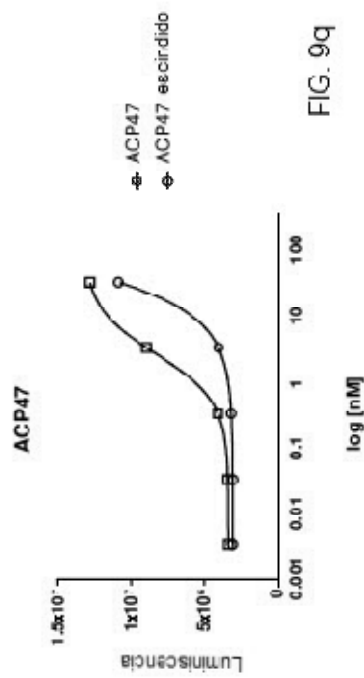
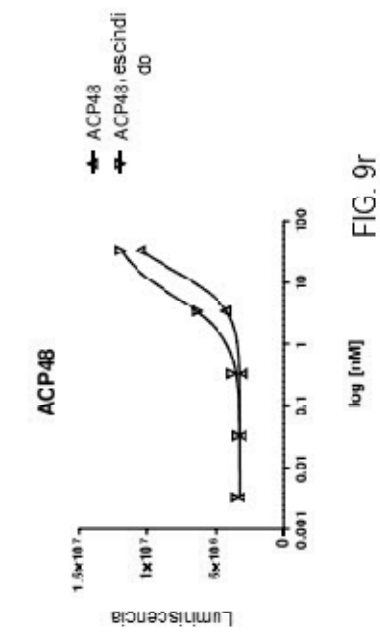


FIG. 9m

FIG. 9p

FIG. 9j

FIG. 9o



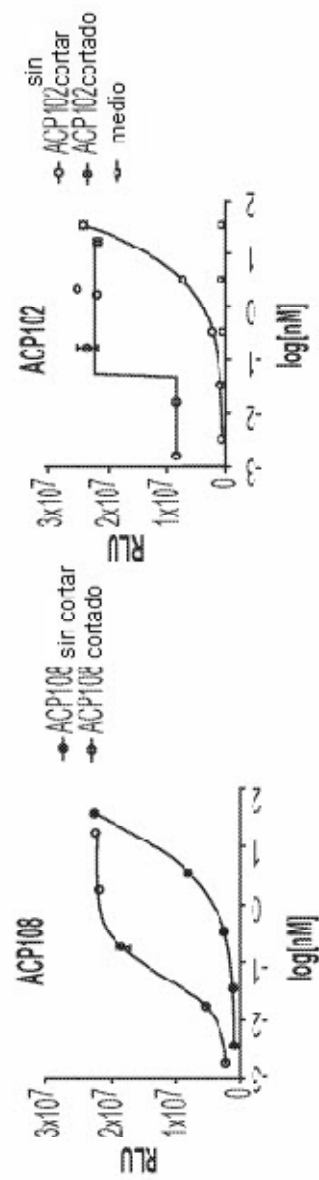


FIG. 9t

FIG. 9u

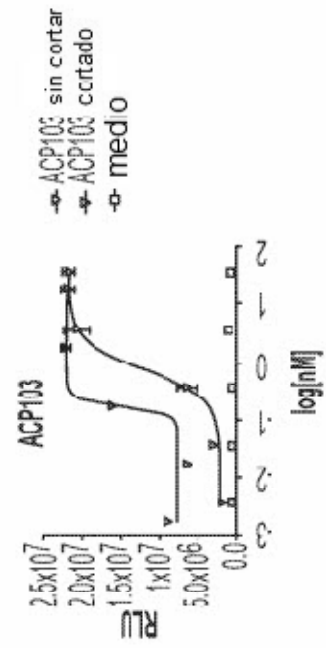


FIG. 9v

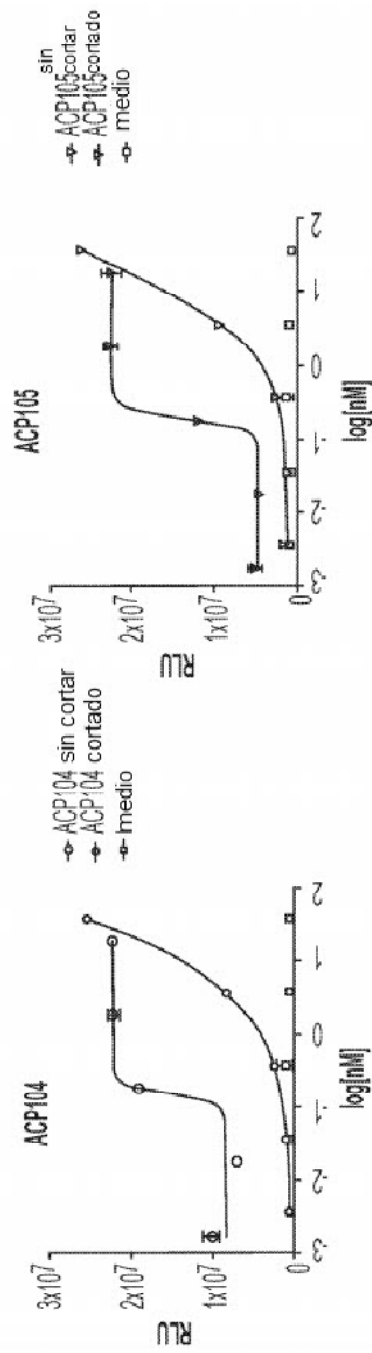


FIG. 9w

FIG. 9x

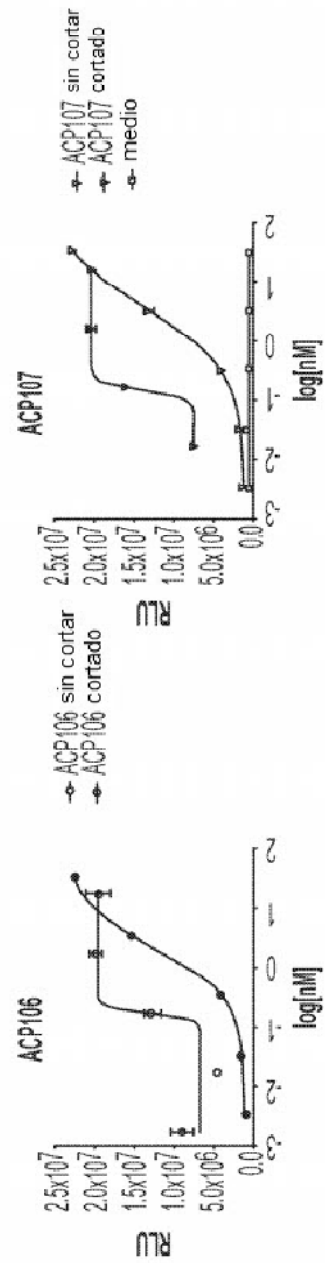


FIG. 9y

FIG. 9z

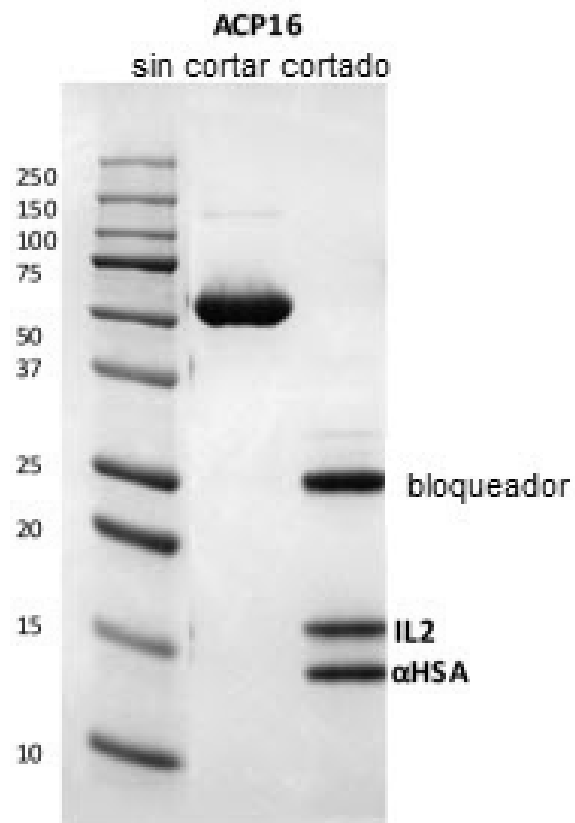


FIG. 10

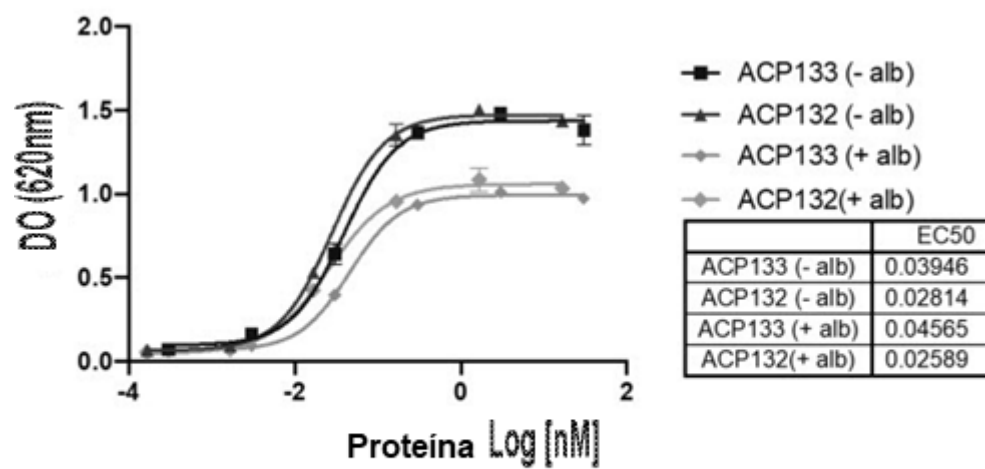


FIG. 11a

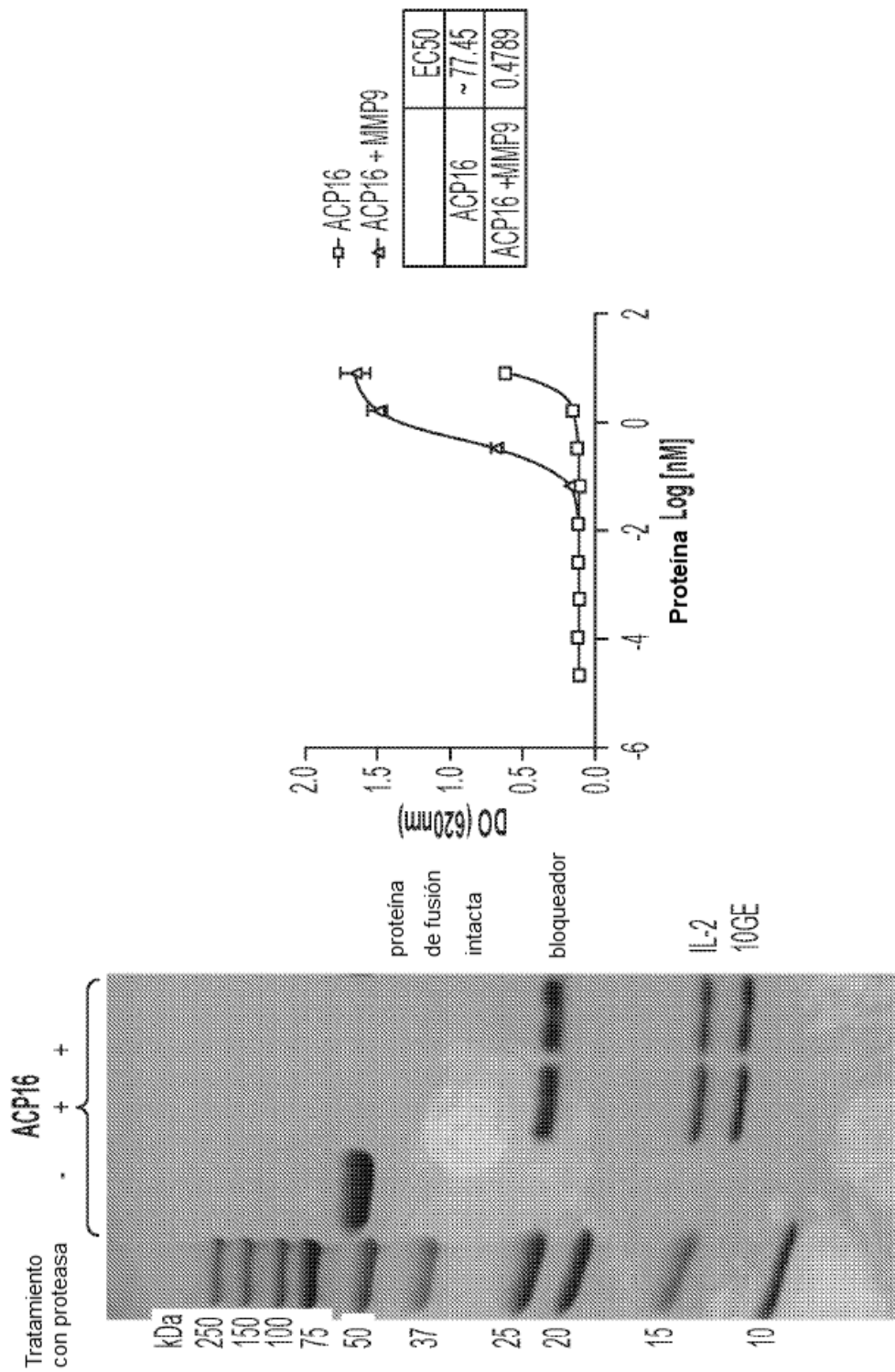


FIG. 11b

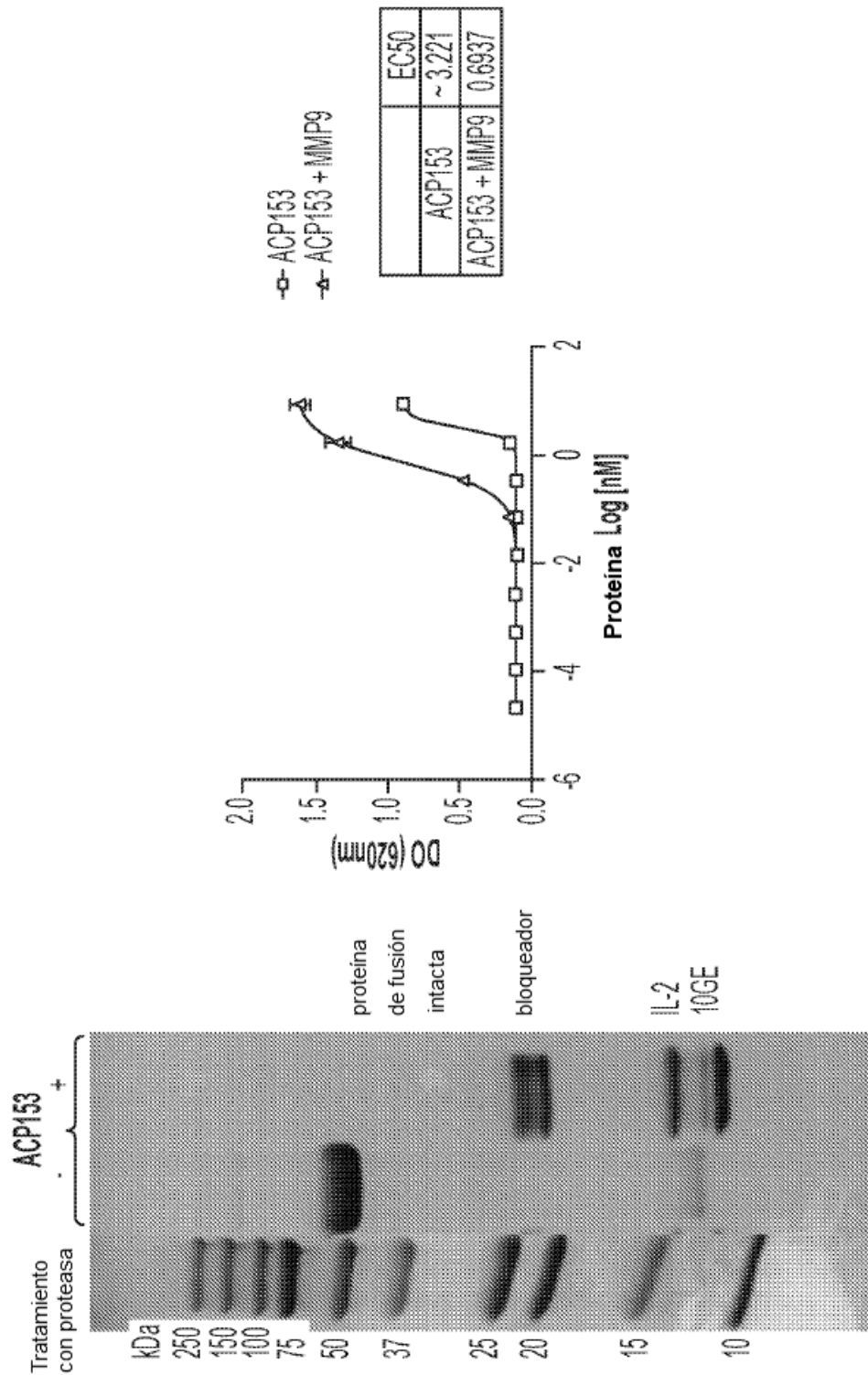
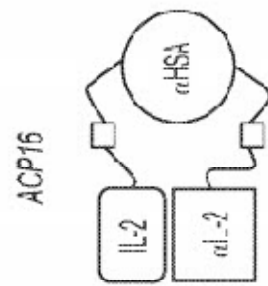


FIG. 11c



* Citocina de tipo salvaje
 ○ Proteína de fusión intacta
 □ Proteína de fusión escindida por
 proteasa

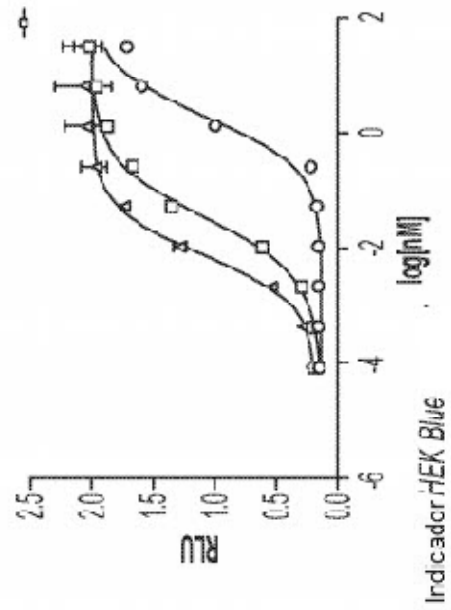


FIG. 11d

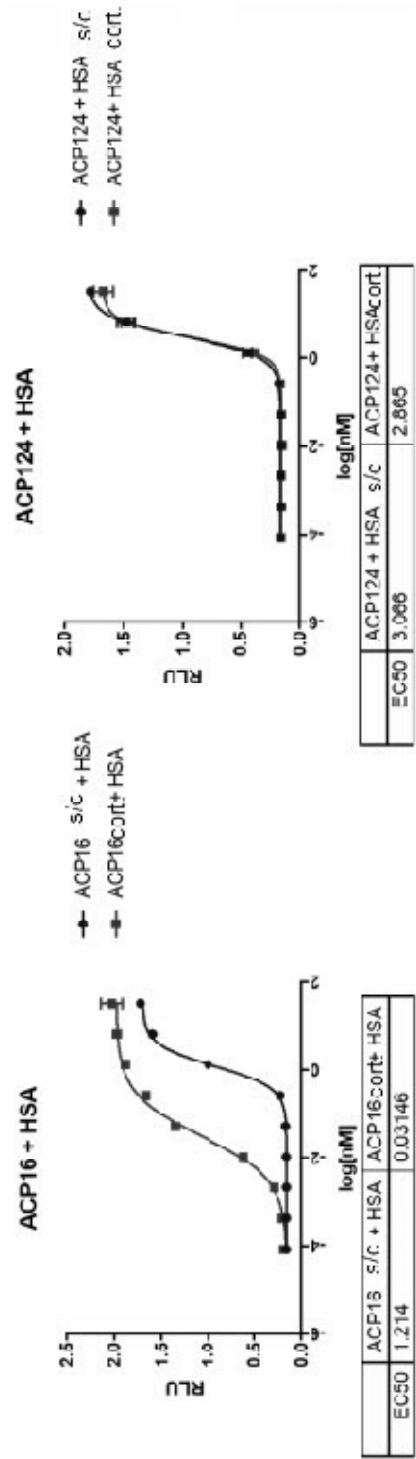
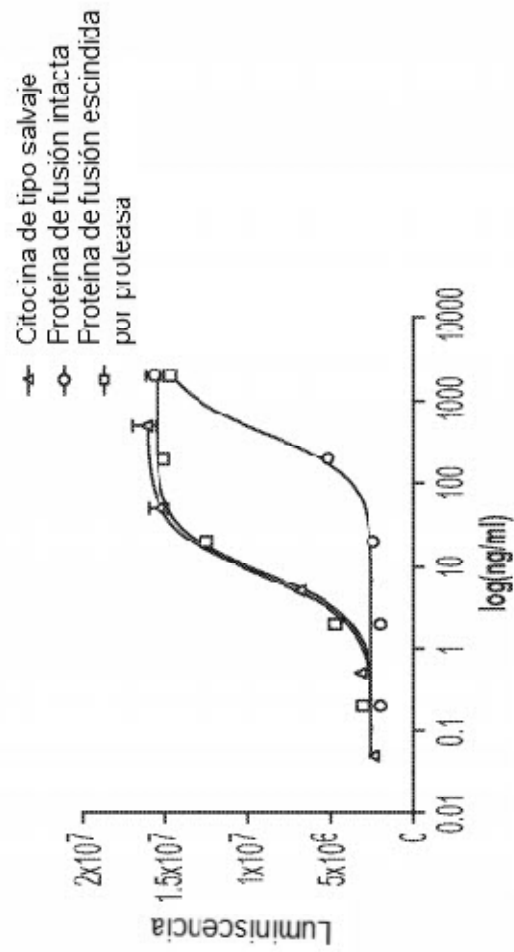
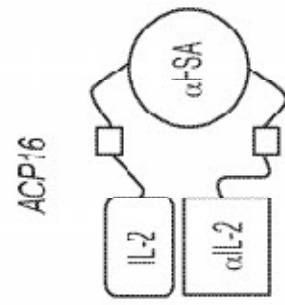


FIG. 12a

FIG. 12b



Ensayo de proliferación de CTLL-2

FIG. 12c

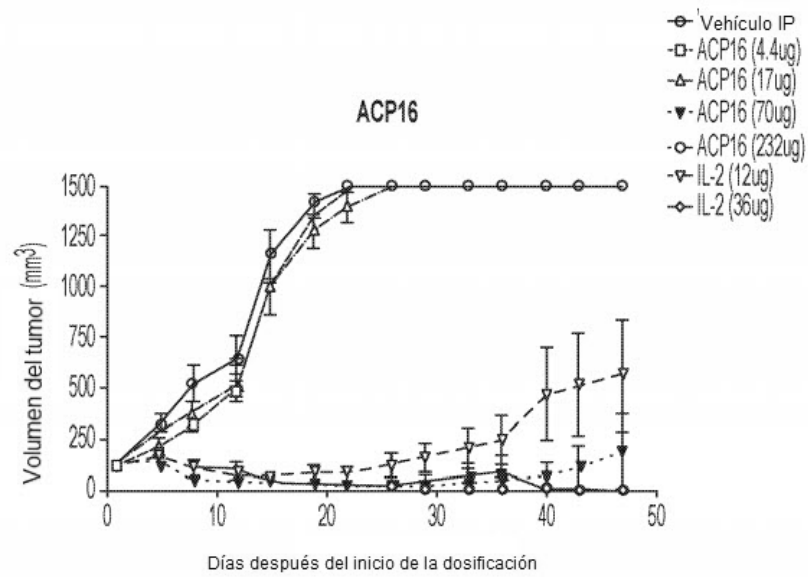


FIG. 13a

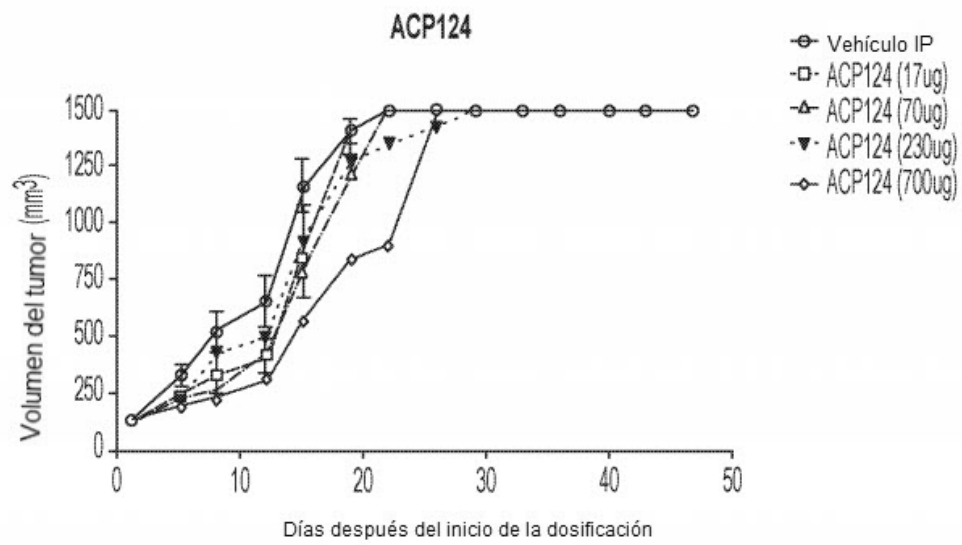


FIG. 13b

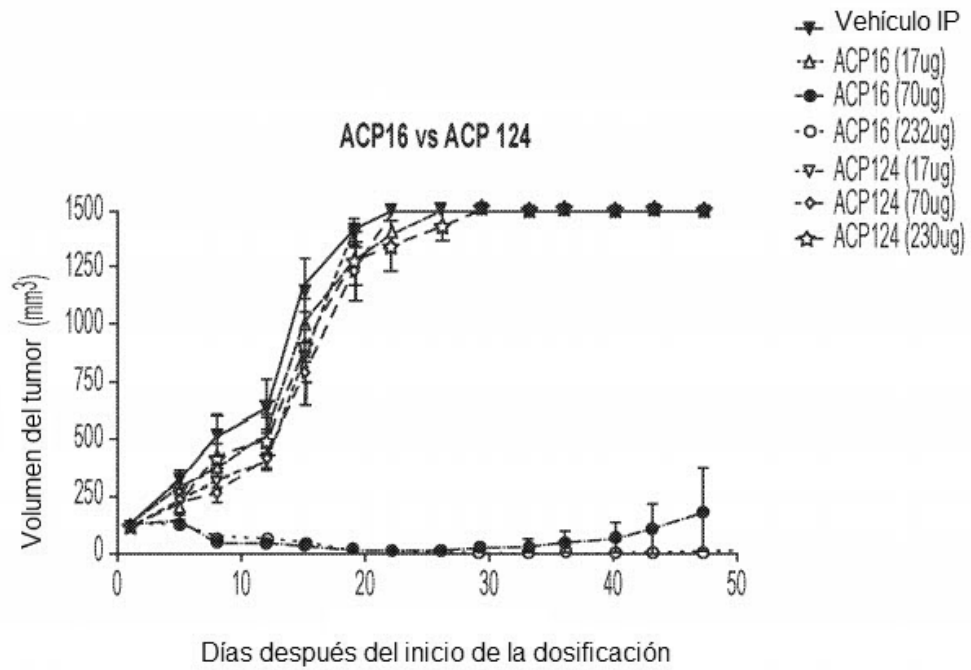


FIG. 13c

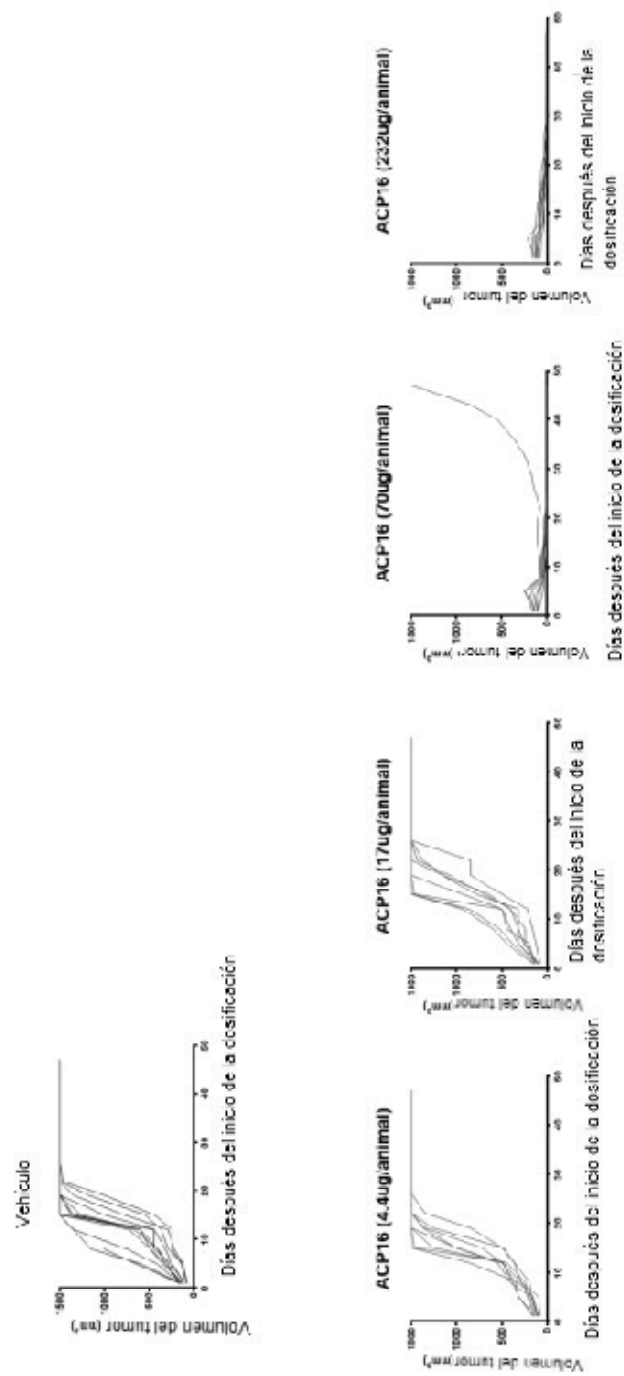


FIG. 14a

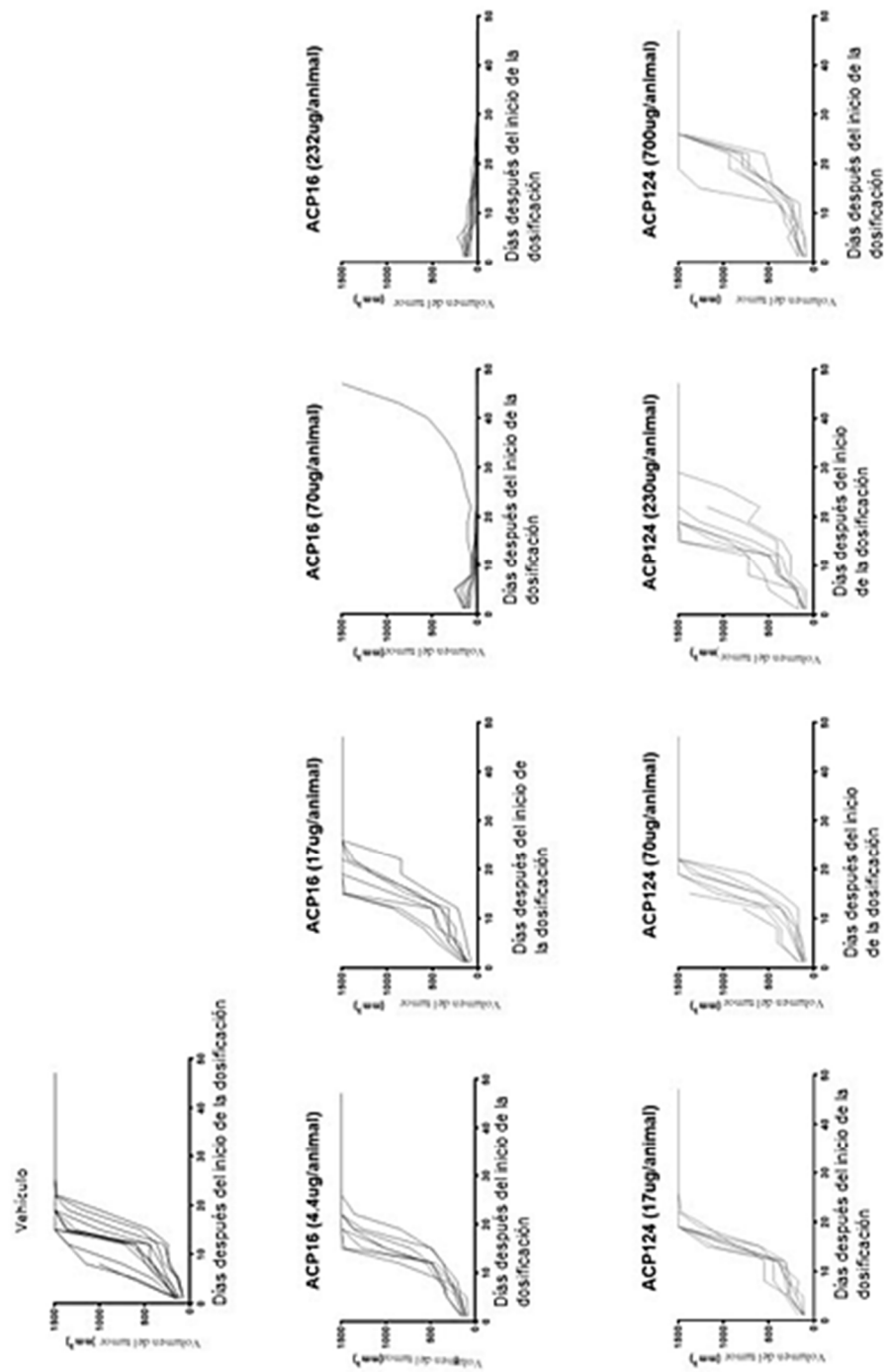


FIG. 14b

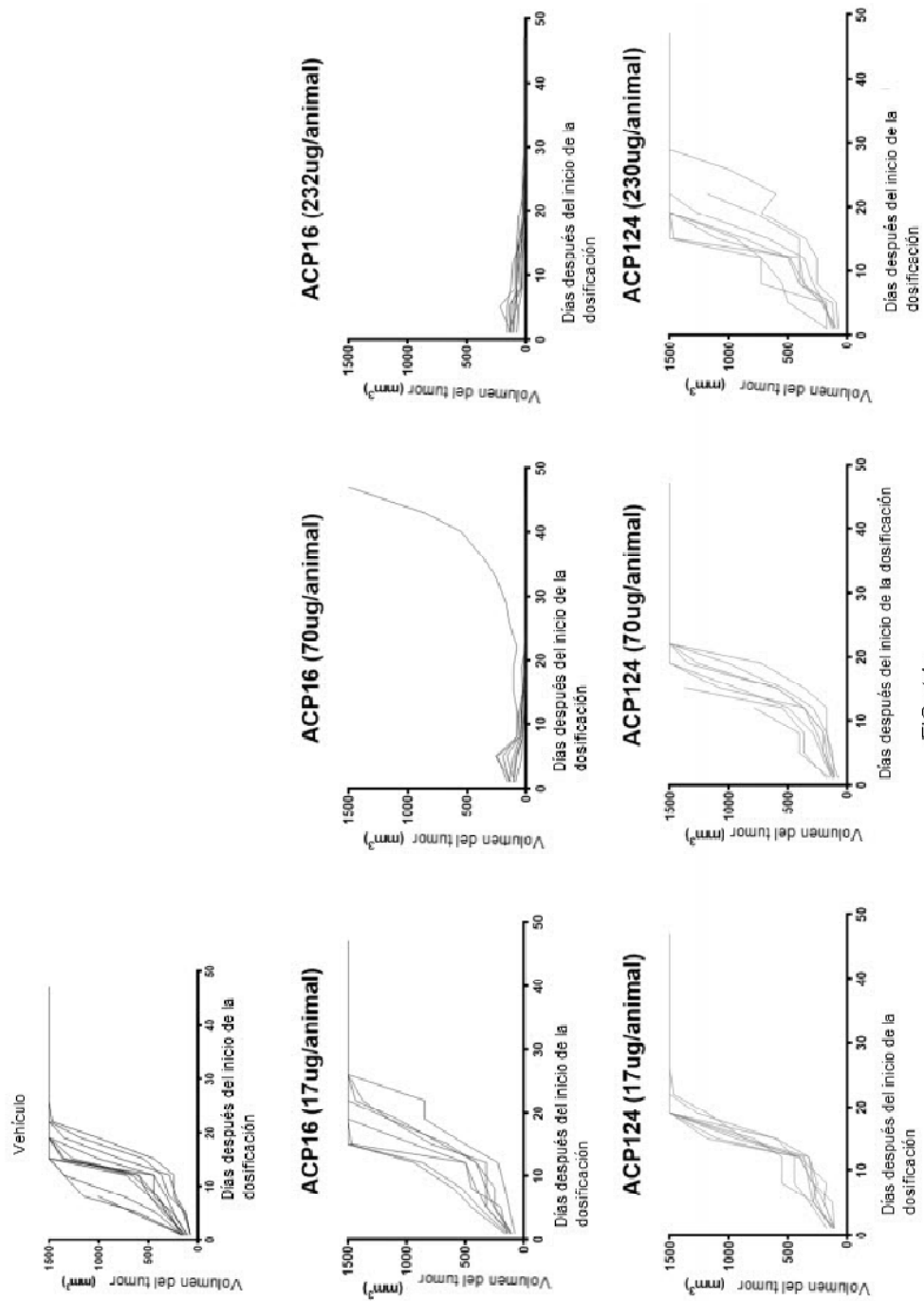


FIG. 14c

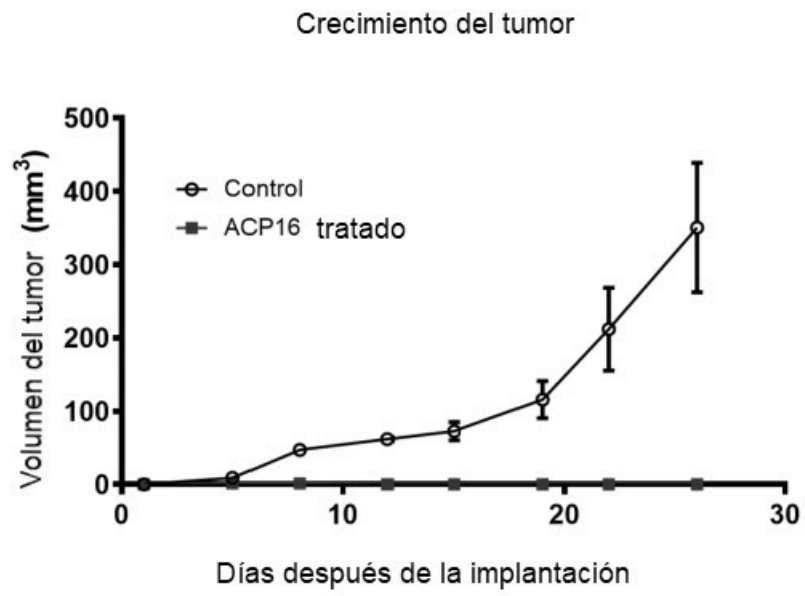


FIG. 15

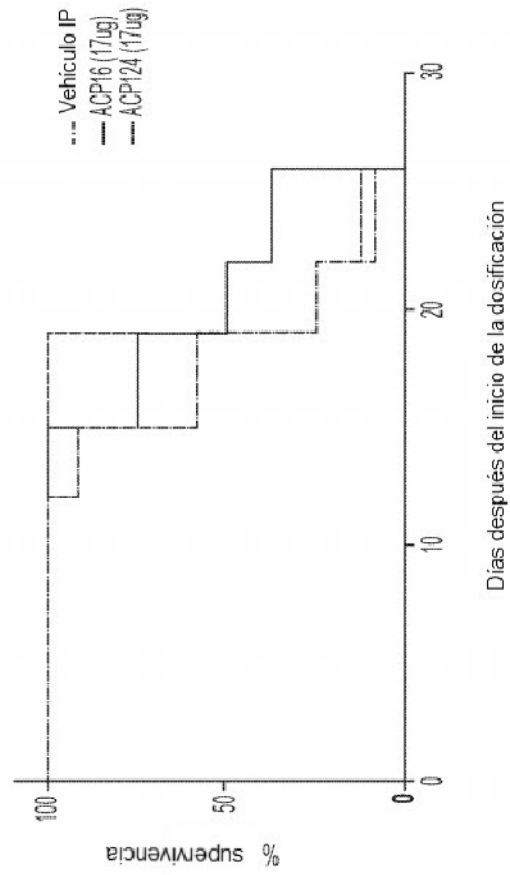


FIG. 16a

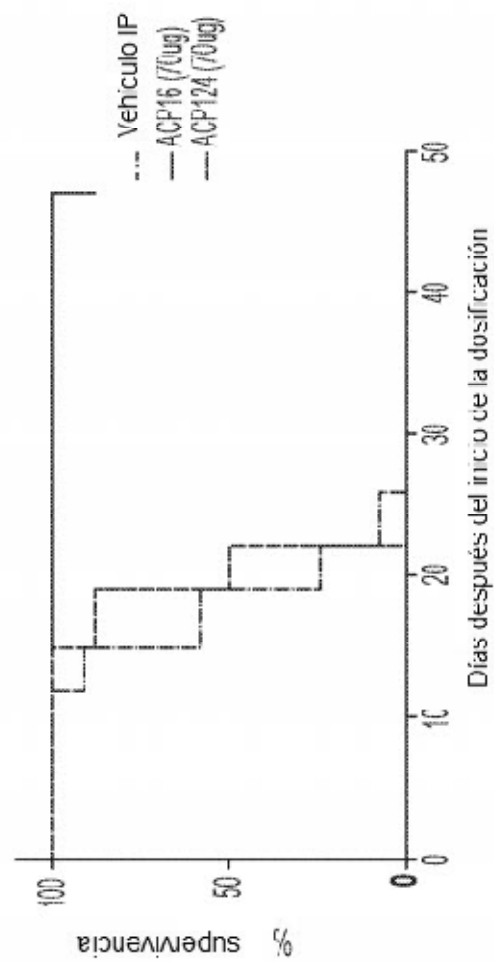


FIG. 16b

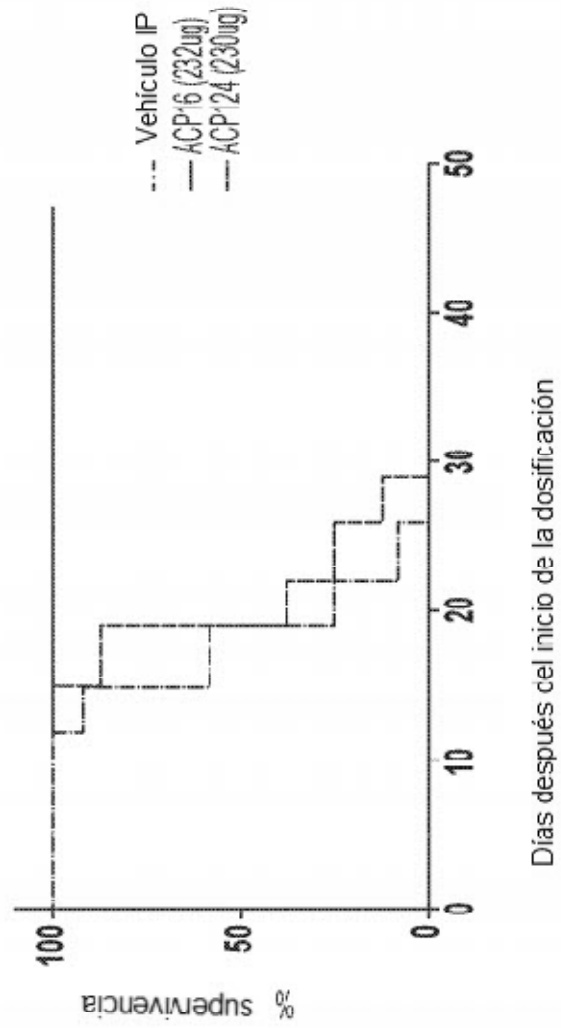


FIG. 16c

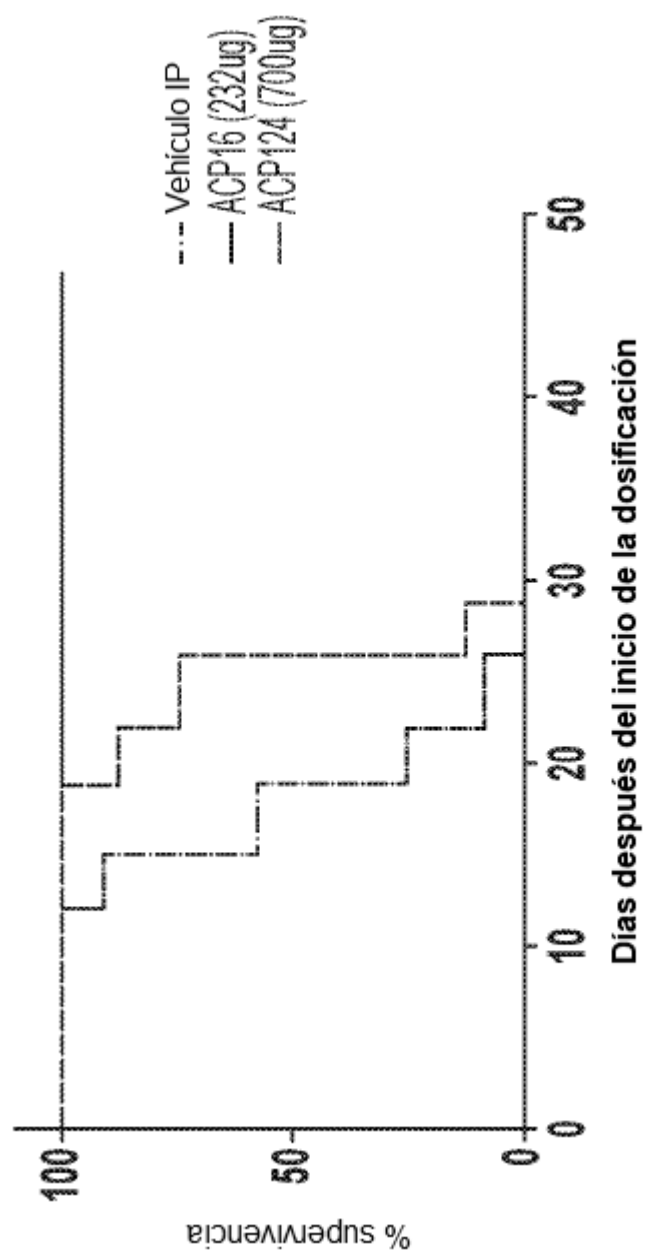
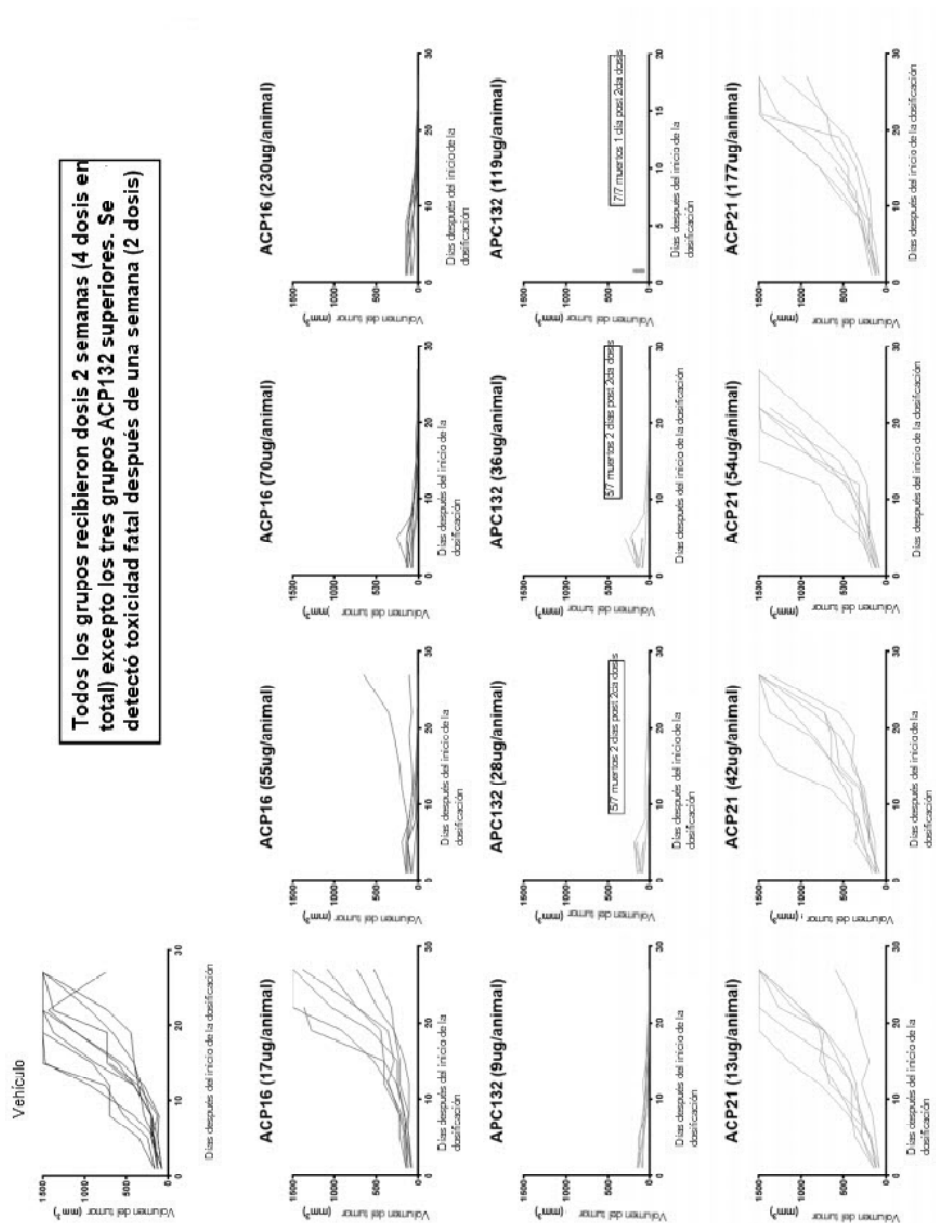
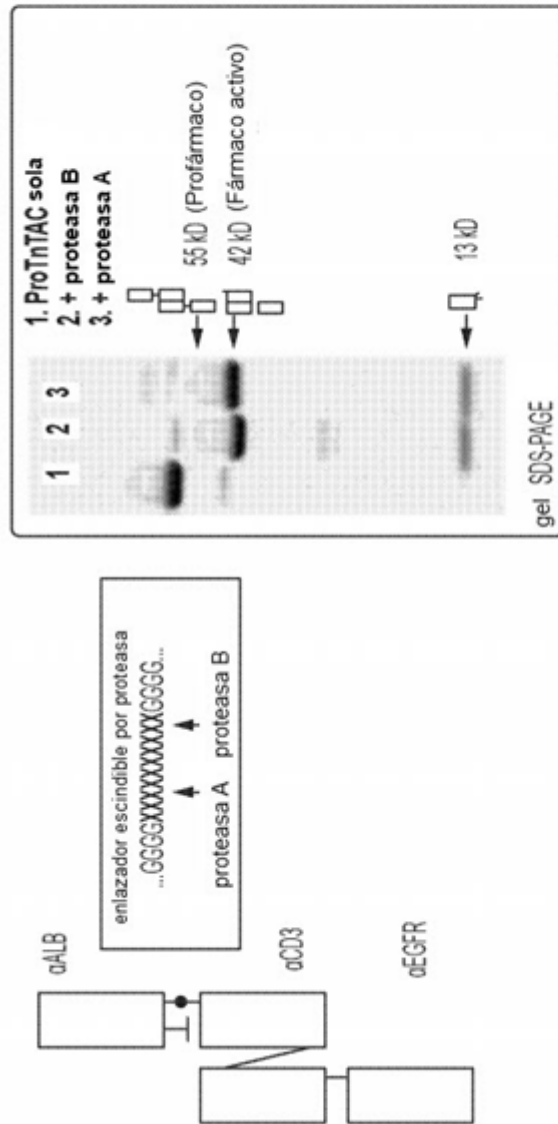


FIG. 16d

FIG. 17



ProTnTACs son activables por proteasas asociadas a tumores

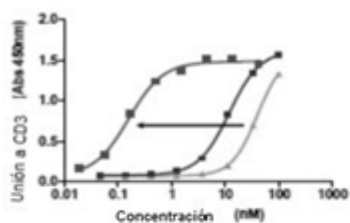


• Biblioteca patentada de enlazadores de sustrato con diferente capacidad de escisión preparada por ingeniería

FIG. 18

Actividad diferencial respaldada por varios ensayos in vitro

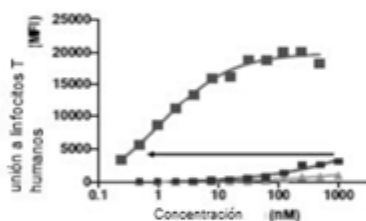
250X Diferencial en unión a CD3 (ELISA)



■ Fármaco activo
● Profármaco
△ Profármaco (no escindible)

	EC ₅₀ (nM)	Tasa de enmascaramiento
Fármaco activo	0.16	-
Profármaco	11.91	74
Profármaco (no escindible)	59.44	247

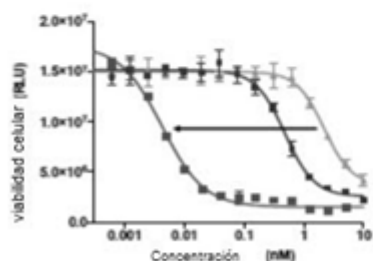
>1000X Diferencial en unión a linfocitos T primarios humanos (FACS)



■ Fármaco activo
● Profármaco
△ Profármaco (no escindible)

	EC ₅₀ (nM)	Tasa de enmascaramiento
Fármaco activo	1.19	-
Profármaco	>1000	n/a
Profármaco (no escindible)	>1000	n/a

550X Diferencial en actividad citolítica de linfocitos T (TDCC)



■ Fármaco activo
● Profármaco
△ Profármaco (no escindible)

	EC ₅₀ (nM)	Tasa de enmascaramiento
Fármaco activo	0.004	-
Profármaco	0.485	121
Profármaco (no escindible)	2.197	549

- Conectar y usar: el enmascaramiento demostrado con >20 aglutinantes a 5 objetivos diferentes

FIG. 19

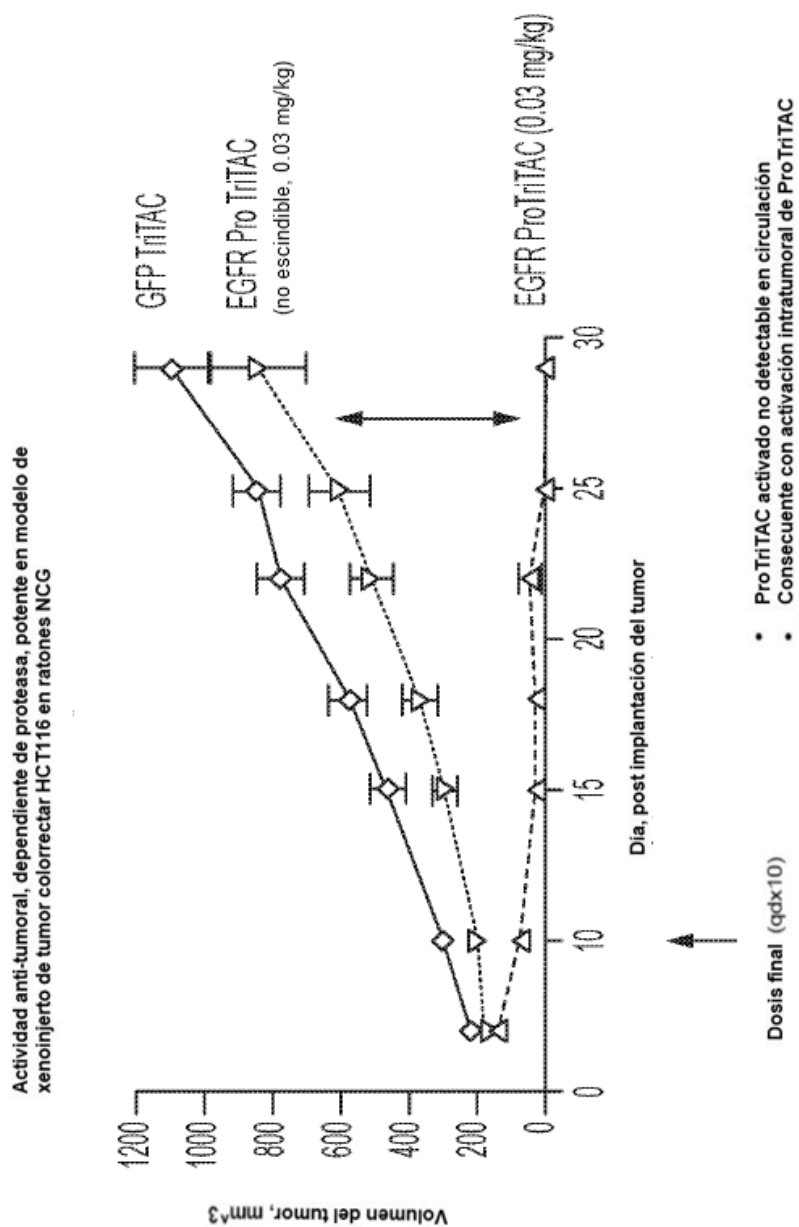


FIG. 20

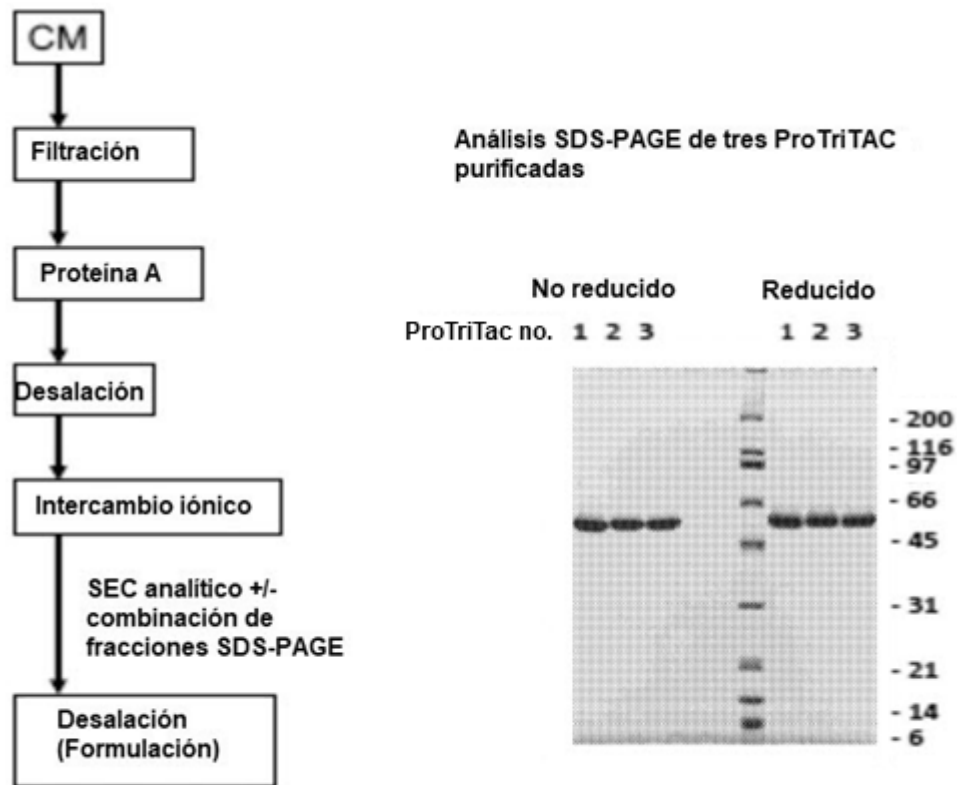
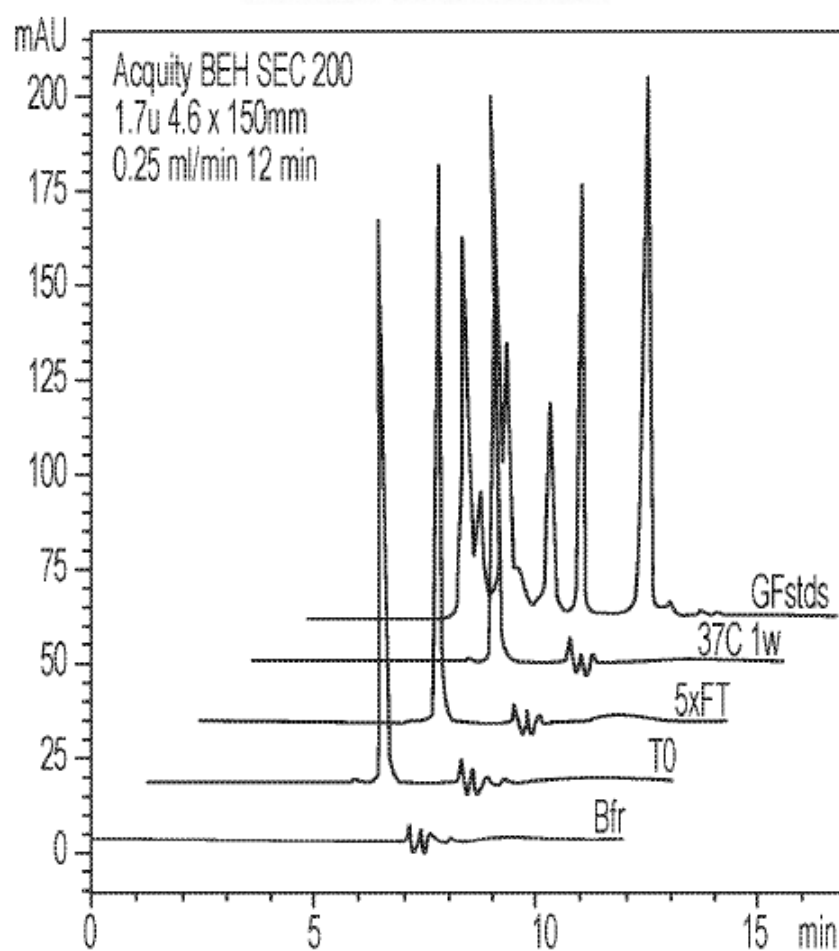


FIG. 21

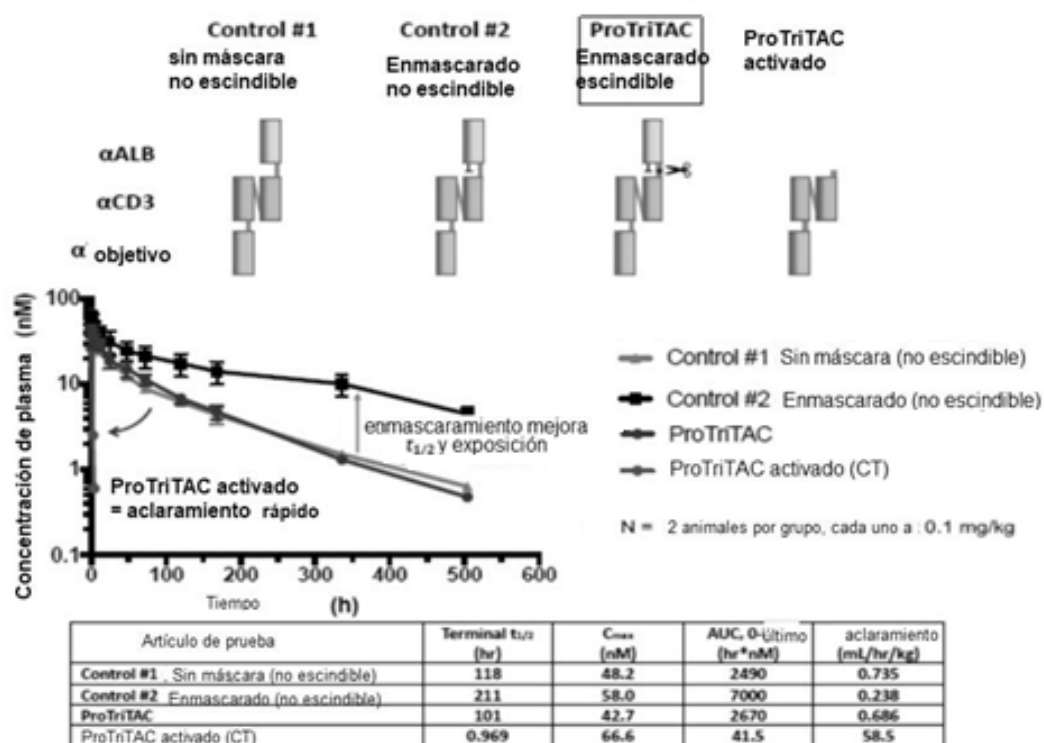
SEC analítico de ProTriTAC después de
condiciones de estrés diferentes



Condición	%HMW	%Principal	%LMW
T0	1.7	96.0	2.3
5x FT	1.6	97.0	1.4
37C 1w	2.6	95.4	2.0

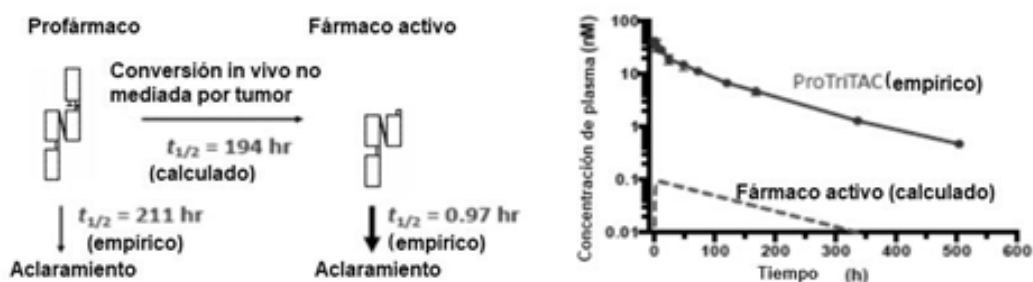
FIG. 22

Estudio PK de dosis única para investigar el enmascaramiento funcional y estabilidad de ProTriTAC en monos cynomolgus



Protección dual contra actividad tumoral en el objetivo y fuera del objetivo

- Unión limitada a linfocitos T periféricos (demostrada por PK mejorada a partir del enmascaramiento)
- Aclaramiento rápido de fármaco activo en circulación



- El enlazador de sustrato es lo suficientemente estable en circulación: 50 % de conversión cada 194 h
- Fármaco activo no se acumula en circulación: por debajo de 0.5 % de profármaco en todo momento

FIG. 23