

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 989 063**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2018 PCT/US2018/022492**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18170168**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2018 E 18768154 (9)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3596118**

(54) Título: **Combinación de polipéptidos de fusión multiméricos e inhibidor del punto de control inmunitario para el tratamiento de cáncer asociado a HPV**

(30) Prioridad:

**15.03.2017 US 201762471832 P
16.06.2017 US 201762521009 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2024

(73) Titular/es:

**CUE BIOPHARMA, INC. (100.0%)
40 Guest Street
Boston, MA 02135, US**

(72) Inventor/es:

**SEIDEL, III, RONALD D. y
CHAPARRO, RODOLFO J.**

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 2 989 063 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

Combinación de polipéptidos de fusión multiméricos e inhibidor del punto de control inmunitario para el tratamiento de cáncer asociado a HPV

5

Introducción

10

Una respuesta inmunitaria adaptativa implica el acoplamiento del receptor de linfocitos T (TCR) presente en la superficie de un linfocito T, con un antígeno de péptido pequeño presentado de forma no covalente en la superficie de una célula que presenta antígenos (APC) mediante un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; al que también se hace referencia en seres humanos como complejo de antígeno leucocitario humano (HLA)). Este acoplamiento representa el mecanismo de selección de diana del sistema inmunitario y es una interacción molecular necesaria para la modulación (activación o inhibición) de linfocitos T y la función efectora. Luego de la selección de células como diana específicas al epítopo, los linfocitos T seleccionados se activan a través del acoplamiento de proteínas coestimuladoras que se encuentran en la APC con proteínas coestimuladoras de los linfocitos T equivalentes. Ambas señales, epítopo/unión a TCR y acoplamiento de proteínas coestimuladoras de APC con proteínas coestimuladoras de linfocitos T, son necesarias para impulsar la especificidad y activación o inhibición de linfocitos T. El TCR es específico para un epítopo dado; sin embargo, la proteína coestimuladora no es específica para el epítopo y, en cambio, generalmente se expresa en todos los linfocitos T o en grandes subconjuntos de linfocitos T.

15

Resumen

20

La presente descripción proporciona una composición que comprende un polipéptido multimérico para el uso en un método para tratar un cáncer asociado a HPV en un paciente humano, el método comprende administrar un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario,

25

en donde el polipéptido multimérico comprende un heterodímero que tiene:

30

- a) un primer polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:
 - i) un epítopo de HPV16 E7 que comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPETT (SEQ ID NO:77);
 - ii) un primer polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que es un polipéptido β 2-microglobulina (β 2M) que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 34A (SEQ ID NO:48); y

35

- b) un segundo polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:
 - i) un polipéptido de IL-2 variante, que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B (SEQ ID NO: 49);
 - ii) un segundo polipéptido de MHC que es un polipéptido de cadena pesada de MHC clase I que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C (SEQ ID NO:50); y
 - iii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig).

Breve descripción de las figuras

40

Las Figuras 1A-1D ilustran esquemáticamente diversas modalidades de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T. En estas modalidades, los enlaces disulfuro se forman entre polipéptidos de MHC (por ejemplo, HLA) presentes en polipéptidos separados.

45

Las Figuras 2A-2Q proporcionan una secuencia de aminoácidos de IL-2 humana de tipo salvaje (Figura 2A); y secuencias de aminoácidos de polipéptidos de IL-2 variantes (Figuras 2B-2Q).

50

Las Figuras 3A-3C proporcionan secuencias de aminoácidos de cadena alfa (Figura 3A), cadena beta (Figura 3B) y cadena gamma (Figura 3C) del receptor de IL-2.

Las Figuras 4A-4C proporcionan secuencias de aminoácidos de polipéptidos de Fc de inmunoglobulina.

55

Las Figuras 5A-5C proporcionan secuencias de aminoácidos de polipéptidos de cadena pesada del antígeno leucocitario humano (HLA) clase I. Las secuencias señal están subrayadas.

La Figura 6 proporciona una alineación de secuencia de aminoácidos múltiple de precursores de microglobulina beta-2 (β 2M) (es decir, que incluye la secuencia líder) de *Homo sapiens* (NP_004039.1; SEQ ID NO:95), *Pan troglodytes* (NP_001009066.1; SEQ ID NO:195), *Macaca mulatta* (NP_001040602.1; SEQ ID NO:96), *Bos Taurus* (NP_776318.1; SEQ ID NO:97) y *Mus musculus* (NP_033865.2; SEQ ID NO:98). Los aminoácidos 1-20 son un péptido señal.

60

Las Figuras 7A-7B ilustran la producción de IL-2/synTac ("Cue-IL-2-a" y Cue-IL-2-b") de la presente descripción luego de la transfección transitoria. Figura 7A representa los rendimientos no purificados; la Figura 7B representa el producto purificado.

65

Las Figuras 8A-8B ilustran la producción de IL-2/synTac de la presente descripción, en la que el polipéptido de IL-2 se encuentra presente en la cadena ligera (la cadena de polipéptidos con la cadena ligera (por ejemplo,

- β2M) de una molécula de MHC clase I) o en la cadena pesada (la cadena de polipéptidos con la cadena pesada de una molécula de MHC clase I).
 La Figura 9 representa el nivel de expresión de IL-2/syn-Tac, en el que la IL-2 es de tipo salvaje (wt), o comprende varias combinaciones de F42A, D20K, Q126A, E15A, Y45A y H16A.
 5 La Figura 10 representa la expresión de IL-2/syn-Tac de la presente descripción, en la que la IL-2 se encuentra presente en una copia (1X), dos copias (2X) o tres copias (3X) en el syn-Tac.
 La Figura 11 representa la estimulación *in vitro* de linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno y linfocitos T CD8⁺ no específicos mediante un IL-2/syn-Tac de la presente descripción, donde la IL-2 variante que comprende sustituciones de F42A y H16A se encuentra presente en el syn-Tac en dos copias.
 10 La Figura 12 representa la unión de IL-2/syn-Tac a linfocitos T CD8⁺ específicos (virus de cito-meningitis linfocítica; LCMV) o no específicos (OT1; que reconocen ovoalbúmina).
 La Figura 13 representa la señalización mediada por IL-2/syn-Tac en linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno (LCMV) o no específicos (BL6).
 Las Figuras 14A-14F representan el por ciento de células positivas para fosfo-transductor de señal y activador de transcripción 5 (pSTAT5) luego de la estimulación de células CD8⁺ específicas para el antígeno (LCMV) o no específicas (BL6) con IL-2/syn-Tac de la presente descripción a diversas concentraciones de IL-2/syn-Tac.
 15 La Figura 15 representa la actividad *in vivo* de un IL-2/syn-Tac de la presente descripción. El panel izquierdo representa el cambio de veces en la cantidad de linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno luego de la administración de solución salina amortiguada con fosfato (PBS), IL-2 recombinante (rIL-2) o un IL-2/syn-Tac de la presente descripción. El panel derecho representa las respuestas específicas para el antígeno y no específicas para el antígeno luego de la administración de PBS, rIL-2 o un IL-2/syn-Tac de la presente descripción.
 20 Las Figuras 16A-16B representan los efectos de dosis escalonada (Figura 16A) y vía de administración (Figura 16B).
 Las Figuras 17A-17B representan el efecto de la cantidad de copias de IL-2 en la eficacia *in vivo* contra un tumor.
 25 La Figura 18 representa la semivida en suero de un IL-2/syn-Tac de la presente descripción, luego de la administración intraperitoneal del IL-2/syn-Tac en una cantidad de 10 mg/kg.
 La Figura 19 representa la estabilidad de un IL-2/syn-Tac de la presente descripción 2 horas después de la administración intraperitoneal del IL-2/syn-Tac en una cantidad de 10 mg/kg.
 30 La Figura 20 representa los datos de cromatografía de exclusión por tamaño en un IL-2/syn-Tac de la presente descripción luego de mantener el IL-2/syn-Tac a 4 °C o 37 °C durante 5 días.
 La Figura 21 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un IL-2/syn-Tac de la presente descripción, con un péptido líder, donde la cadena pesada de IL-2/syn-Tac comprende una Fc de IgG1 con una sustitución de N297A.
 35 La Figura 22 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un IL-2/syn-Tac de la presente descripción, sin un péptido líder, donde la cadena pesada de IL-2/syn-Tac comprende una Fc de IgG1 con una sustitución de N297A.
 Las Figuras 23A-23B proporcionan una secuencia de nucleótidos (Figura 23A) que codifica la cadena pesada de IL-2/syn-Tac representada en la Figura 21; y una clave (Figura 23B) en la secuencia.
 40 La Figura 24 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un IL-2/syn-Tac, con un péptido líder, donde la cadena pesada de IL-2/syn-Tac comprende una Fc de IgG1 con sustituciones de L234A y L235A.
 La Figura 25 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un IL-2/syn-Tac, sin un péptido líder, donde la cadena pesada de IL-2/syn-Tac comprende una Fc de IgG1 con sustituciones de L234A y L235A.
 45 Las Figuras 26A-26B proporcionan una secuencia de nucleótidos (Figura 26A) que codifica la cadena pesada de IL-2/syn-Tac representada en la Figura 24; y una clave (Figura 26B) en la secuencia.
 La Figura 27 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un IL-2/syn-Tac, con un péptido líder, donde la cadena pesada de IL-2/syn-Tac comprende una Fc de IgG1 con sustituciones de L234F, L235E y P331S.
 50 La Figura 28 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un IL-2/syn-Tac, sin un péptido líder, donde la cadena pesada de IL-2/syn-Tac comprende una Fc de IgG1 con sustituciones de L234F, L235E y P331S.
 Las Figuras 29A-29B proporcionan una secuencia de nucleótidos (Figura 29A) que codifica la cadena pesada de IL-2/syn-Tac representada en la Figura 27; y una clave (Figura 29B) en la secuencia.
 55 La Figura 30 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un IL-2/syn-Tac, con un péptido líder, donde la cadena ligera de IL-2/syn-Tac comprende un epítopo E7 del virus del papiloma humano (HPV).
 La Figura 31 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un IL-2/syn-Tac, sin un péptido líder, donde la cadena ligera de IL-2/syn-Tac comprende un epítopo E7 de HPV.
 60 La Figura 32 proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de IL-2/syn-Tac representada en la Figura 30.
 Las Figuras 33A-33D proporcionan secuencias de aminoácidos de una Fc de IgG1 humana de tipo salvaje (Figura 33A), una Fc de IgG1 con sustituciones de L234F, L235E y P331S (Figura 33B), una Fc de IgG1 con una sustitución de N297A (Figura 33C) y una Fc de IgG1 con sustituciones de L234A y L235A (Figura 33D).
 65 Las Figuras 34A-34C proporciona la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de microglobulina β2 (R12C) (Figura 34A), un polipéptido de IL-2 variante (H16A; F42A) (Figura 34B) y una cadena H de MHC clase I A0201 (Y84A; A236C) (Figura 34C).

La Figura 35 representa los efectos sinérgicos de un IL-2/synTac y un anticuerpo anti-PD1 en la reducción del volumen tumoral.

Las Figuras 36A-36III proporciones una secuencia de aminoácidos de un 4-1BBL (Figura 36A) y ejemplos de variantes de polipéptidos 4-1BBL (Figura 36B-36III).

5 La Figura 37 proporciona una secuencia de aminoácidos de 4-1BB.

Las Figuras 38A-38B representan la secreción de interferón gamma (IFN- γ) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 38A) o 5 días (Figura 8B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

10 Las Figuras 39A-39B representan la secreción de interleucina-2 (IL-2) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 39A) o 5 días (Figura 9B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

Las Figuras 40A-40B representan la secreción de interleucina-6 (IL-6) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 40A) o 5 días (Figura 40B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

15 Las Figuras 41A-41B representan la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 41A) o 5 días (Figura 41B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

Las Figuras 42A-42B representan la secreción de interleucina-10 (IL-10) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 42A) o 5 días (Figura 42B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

20 20 Las Figuras 43A-43B representan la secreción de interleucina-17A (IL-17A) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 43A) o 5 días (Figura 43B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

Las Figuras 44A-44B representan la secreción de interleucina-4 (IL-4) por las células diana en contacto con un polipéptido synTac durante 3 días (Figura 44A) o 5 días (Figura 44B) de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

25 La Figura 45 representa la proliferación de células diana en contacto con un polipéptido synTac de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

La Figura 46 representa la viabilidad de las células diana puestas en contacto con un polipéptido synTac de acuerdo con una modalidad de la presente descripción.

30 La Figura 47 representa los niveles de expresión de varios polipéptidos synTac producidos en células CHO.

La Figura 48 representa el efecto *in vivo* de un polipéptido synTac de la presente descripción sobre el volumen tumoral.

35 La Figura 49 representa el efecto de la coadministración de varias dosis de un 4-1BBL/synTac y un anticuerpo anti-PD1 sobre la masa tumoral y el por ciento de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) granzima B+.

Las Figuras 50A-50B proporcionan secuencias de aminoácidos de polipéptidos PD-L1.

La Figura 51 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido CD80.

La Figura 52 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido ICOS-L.

40 La Figura 53 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido OX40L.

La Figura 54 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido PD-L2.

La Figura 55 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido CD86 (B7-2).

45 La Figura 56 proporciona una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ligando de Fas (FAS-L).

Definiciones

45 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico", usados de manera indistinta en la presente descripción, hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, de modo no limitante, ADN o ARN de hebra simple, doble o múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química o biológicamente, no naturales o derivadas.

50 55 Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente descripción y hacen referencia a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, la que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados química o bioquímicamente o derivados y polipéptidos con cadenas principales peptídicas modificadas.

60 Un polinucleótido o polipéptido tiene un determinado por ciento de "identidad de secuencia" con respecto a otro polinucleótido o polipéptido, lo que significa que, cuando se encuentra alineado, ese porcentaje de bases o aminoácidos son los mismos y están en las mismas posiciones relativas cuando se comparan las dos secuencias. La identidad de secuencia se puede determinar de una cantidad de formas diferentes. Para determinar la identidad de secuencia, las secuencias pueden alinearse mediante el uso de varios métodos y programa de computadora convenientes (por ejemplo, BLAST, T-COFFEE, MUSCLE, MAFFT, etc.), disponibles en la web en sitios que incluyen ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/, ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/, mafft.cbrc.jp/alignment/software/. Ver, por ejemplo, Altschul y otros (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10.

- La expresión "sustitución de aminoácidos conservados" hace referencia al carácter intercambiable en las proteínas de aminoácidos residuales que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas consiste de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxialifáticas consiste en serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amidas consiste en asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas consiste en fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas consiste en lisina, arginina e histidina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales ácidas consiste en glutamato y aspartato; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre consiste en cisteína y metionina. Los grupos ilustrativos de sustitución de aminoácidos conservados son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina-glicina y asparagina-glutamina.
- "Unión", como se usa en la presente (por ejemplo, con referencia a la unión de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T a un polipéptido (por ejemplo, un receptor de linfocitos T) en un linfocito T) hace referencia a una interacción no covalente entre ellos. Las interacciones de unión generalmente se caracterizan por una constante de disociación (K_D) de menos de 10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M, menos de 10^{-12} M, menos de 10^{-13} M, menos de 10^{-14} M o menos de 10^{-15} M. "Afinidad" hace referencia a la resistencia de unión, la mayor afinidad de unión se correlaciona con una menor K_D .
- Las expresiones "sinapsis inmunológica" o "sinapsis inmunitaria", tal como se usan en la presente, generalmente hacen referencia a la interfaz natural entre dos células inmunitarias de interacción de una respuesta inmunitaria adaptativa que incluye, por ejemplo, la interfaz entre una célula que presenta el antígeno (APC) o célula diana y una célula efectora, por ejemplo, un linfocito, un linfocito T efector, un linfocito citolítico y similares. Una sinapsis inmunológica entre una APC y un linfocito T generalmente se inicia mediante la interacción de un receptor de antígenos de linfocitos T y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, por ejemplo, tal como se describió en Bromley y otros, Annu Rev Immunol. 2001;19:375-96.
- "Linfocito T" incluye todos los tipos de células inmunitarias que expresan CD3, los que incluyen linfocitos T auxiliares (células CD4⁺), linfocitos T citotóxicos (células CD8⁺), linfocitos T reguladores (Treg) y células NK-T.
- El término "polipéptido coestimulador" (también denominado "polipéptido inmunomodulador"), como se usa en la presente descripción, incluye un polipéptido en una célula presentadora de antígenos (APC) (por ejemplo, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) que se une específicamente a un polipéptido coestimulador cognado en un linfocito T, (también denominado en la presente descripción como un "polipéptido coinmunomodulador cognado"), de esta manera proporciona una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 con un polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) cargado con péptido, media una respuesta de linfocitos T, que incluye, de modo no limitante, la proliferación, la activación, la diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, de modo no limitante, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando Fas (FasL), ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une de forma específica a B7-H3. Un ligando coestimulador también comprende, entre otros, un anticuerpo que se une de forma específica a una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, de modo no limitante, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado a la función del linfocito (LFA-1), CD2, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une de forma específica a CD83.
- Un "dominio modulador" ("MOD") de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de la presente comprende un polipéptido coestimulador, por ejemplo, un polipéptido de IL-2, tal como un polipéptido de IL-2 variante
- "Heterólogo", tal como se usa en la presente, significa un nucleótido o polipéptido que no se encuentra en el ácido nucleico o proteína natural, respectivamente.
- "Recombinante", tal como se usa en la presente, significa que un ácido nucleico (ADN o ARN) en particular es el producto de varias combinaciones de clonación, restricción, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o etapas de ligación que dan como resultado una construcción que tienen una secuencia estructural codificante o no codificante que puede distinguirse de los ácidos nucleicos endógenos que se encuentran en sistemas naturales. Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos pueden ensamblarse a partir de fragmentos de ADNc o a partir de una serie de oligonucleótidos sintéticos, para proporcionar un ácido nucleico sintético que es capaz de ser expresado a partir de una unidad transcripcional recombinante contenida en un sistema de transcripción y traducción celular o libre de células.
- Las expresiones "vector de expresión recombinante" o "construcción de ADN" se usan de manera intercambiable en la presente descripción para hacer referencia a una molécula de ADN que comprende un vector y un inserto. Los vectores de expresión recombinante usualmente se generan con fines de expresar y/o propagar el(s) inserto(s), o para la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. El(Los) inserto(s) puede(n) o no estar unido(s) de manera operativa a una secuencia promotora y puede(n) o no estar unido(s) de manera operativa a secuencias reguladoras de ADN.

Los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos o inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos que retienen la unión específica al antígeno, que incluyen, de modo no limitante, fragmentos Fab, Fv, scFv y Fd, anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple (scAb), anticuerpos de un solo dominio (dAb), anticuerpos de cadena pesada de un solo dominio, anticuerpos de cadena ligera de un solo dominio, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos y proteínas de fusión que comprenden una porción de unión al antígeno (a la que también se hace referencia en la presente descripción como unida al antígeno) de un anticuerpo y una proteína que no es anticuerpo. El término también abarca Fab', Fv, F(ab')₂ y/u otros fragmentos de anticuerpo que retienen la unión específica al antígeno y anticuerpos monoclonales. Como se usa en la presente, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un grupo de células idénticas, las cuales se produjeron a partir de una única célula mediante replicación celular repetitiva. Es decir, el clon de las células solo produce una única especie de anticuerpos. Si bien un anticuerpo monoclonal puede producirse mediante el uso de tecnología de producción de hibridomas, también pueden usarse otros métodos de producción conocidos para los expertos en la técnica (por ejemplo, anticuerpos derivados a partir de bibliotecas de expresión de fagos de anticuerpos). Un anticuerpo puede ser monovalente o bivalente. Un anticuerpo puede ser un monómero de Ig, que es una molécula con "forma de Y" que consiste de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas mediante puentes disulfuro.

El término "anticuerpo humanizado", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que comprende porciones de anticuerpos de orígenes diferentes, en donde al menos una porción comprende secuencias de aminoácidos de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano con la especificidad requerida, tal como un ratón, y de secuencias de inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, inmunoglobulina química) unida químicamente mediante técnicas convencionales (por ejemplo, sintético) o preparado como un polipéptido contiguo mediante el uso de técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, el ADN que codifica las porciones de proteína del anticuerpo químico se puede expresar para producir una cadena de polipéptidos contigua). Otro ejemplo de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que contiene una o más cadenas de anticuerpo que comprenden una CDR derivada de un anticuerpo de origen no humano y una región marco derivada de una cadena ligera y/o pesada de origen humano (por ejemplo, anticuerpos injertados con CDR con o sin cambios de marco). Los anticuerpos de cadena simple injertados con CDR o químicos también están comprendidos en el término inmunoglobulina humanizada. Ver, por ejemplo, Cabilly y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,816,567; Cabilly y otros, patente europea núm. 0,125,023 B1; Boss y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,816,397; Boss y otros, patente europea núm. 0,120,694 B1; Neuberger, M. S. y otros, WO 86/01533; Neuberger, M. S. y otros, patente europea núm. 0,194,276 B1; Winter, patente de Estados Unidos núm. 5,225,539; Winter, Patente Europea núm. 0,239,400 B1; Padlan, E. A. y otros, Solicitud de Patente Europea núm. 0,519,596 A1. Ver también, Ladner y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,946,778; Huston, patente de Estados Unidos núm. 5,476,786; y Bird, R. E. y otros, Science, 242: 423-426 (1988)), con respecto a los anticuerpos de una sola cadena.

Por ejemplo, los anticuerpos humanizados pueden producirse mediante el uso de ácidos nucleicos sintéticos y/o recombinantes para preparar genes (por ejemplo, ADNc) que codifican la cadena humanizada conveniente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifican regiones variables humanizadas pueden construirse mediante el uso de métodos de mutagénesis por PCR para alterar las secuencias de ADN que codifican una cadena humana o humanizada, tal como una plantilla de ADN de una región variable previamente humanizada (ver, por ejemplo, Kamman, M., y otros, Nucl. Acids Res., 17: 5404 (1989)); Sato, K., y otros, Cancer Research, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B. L. y otros, Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); y Lewis, A. P. y J. S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)). Mediante el uso de estos u otros métodos adecuados, también pueden producirse fácilmente variantes. Por ejemplo, las regiones variables clonadas pueden someterse a mutagénesis, y pueden seleccionarse secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, de una biblioteca de fagos; ver por ejemplo, Krebber y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,514,548; Hoogenboom y otros, documento WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993)).

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, por ejemplo, la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y otros, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); anticuerpos de dominio (dAb; Holt y otros, (2003) *Trends Biotechnol.* 21:484); moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv

que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión.

5 El fragmento "Fab" contiene además el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del domino de cadena pesada CH_1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se usa en la presente descripción para el Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

10 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En dependencia de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas clases pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Las subclases pueden dividirse además en tipos, por ejemplo, IgG2a e IgG2b.

15 20 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena simple" o "sFv" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena simple de polipéptidos. En algunas modalidades, el polipéptido Fv comprende además una enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que permite que el sFv forme la estructura conveniente para la unión al antígeno. Para acceder a un análisis de sFv, ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

25 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H - V_L$). Al usar un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos lugares de unión al antígeno. Se describen diacuerpos con mayor detalle, en por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

30 35 Tal como se usa en la presente, el término "afinidad" se refiere a la constante de equilibrio para la unión reversible de dos agentes (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno) y se expresa como una constante de disociación (K_D). La afinidad puede ser al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 6 veces mayor, al menos 7 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 9 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 40 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 60 veces mayor, al menos 70 veces mayor, al menos 80 veces mayor, al menos 90 veces mayor, al menos 100 veces mayor o al menos 1000 veces mayor, o más, que la afinidad de un anticuerpo con respecto a una proteína diana puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nanomolar (nM) a aproximadamente 0,1 nM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 picomolar (pM), o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 femtomolar (fM) o más. Tal como se usa en la presente, el término "avidez" se refiere a la resistencia de un complejo de dos o más agentes a la disociación después de la dilución. Los términos "inmunorreactivo" y "preferentemente une" se usan de manera indistinta en la presente descripción con respecto a anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno.

40 45 50 55 El término "unión" se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas, e iónicas y/o de enlaces de hidrógeno, que incluyen interacciones tales como puentes de sal y puentes de agua. La "unión específica" se refiere a la unión con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o mayor, por ejemplo, 5×10^{-7} M, 10^{-8} M, 5×10^{-8} M, y mayor. "Unión no específica" se refiere a la unión con una afinidad de menor que alrededor de 10^{-7} M, por ejemplo, unión con una afinidad de 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, etc.

60 65 Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" signifique el antígeno no contiguo que combina sitios encontrados dentro de la región variable tanto de los polipéptidos de cadena pesada como de los de cadena ligera. Las CDR han sido descritas por Kabat y otros, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat y otros, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991) (también mencionado en la presente descripción como Kabat 1991); por Chothia y otros, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) (también mencionado en la presente descripción como Chothia 1987); y MacCallum y otros, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), donde las definiciones incluyen residuos de aminoácidos superpuestos al compararlos entre sí o subconjuntos de estos. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para hacer referencia a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de estos se pretende se encuentre comprendida dentro del alcance del término tal como se define y se usa en la presente descripción. Los

residuos de aminoácidos, que abarcan las CDR, definidos por cada una de las referencias citadas anteriormente, se establecen más abajo en la tabla a modo de comparación. Las CDR enumeradas en la Tabla 2 se definieron de acuerdo con Kabat 1991.

5 Tabla: Definiciones de CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
CDR-1 V _H	31-35	26-32	30-35
CDR-2 V _H	50-65	53-55	47-58
CDR-3 V _H	95-102	96-101	93-101
CDR-1 V _L	24-34	26-32	30-36
CDR-2 V _L	50-56	50-52	46-55
CDR-3 V _L	89-97	91-96	89-96

10 ¹ La numeración del residuo sigue la nomenclatura de Kabat y otros, *supra*

15 ² La numeración del residuo sigue la nomenclatura de Chothia y otros, *supra*

³ La numeración del residuo sigue la nomenclatura de MacCallum y otros, *supra*

Tal como se usa en la presente, los términos "CDR-L1", "CDR-L2" y "CDR-L3" se refieren, respectivamente, a la primera, segunda y tercera CDR en una región variable de la cadena ligera. Tal como se usa en la presente, los términos "CDR-H1", "CDR-H2" y "CDR-H3" se refieren, respectivamente, a la primera, segunda y tercera CDR en una región variable de la cadena pesada. Tal como se usa en la presente, los términos "CDR-1", "CDR-2" y "CDR-3" se refieren, respectivamente, a la primera, segunda y tercera CDR de la región variable de cualquiera de las cadenas.

20 Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "marco", cuando se usa en referencia a una región variable de anticuerpo, signifique todos los residuos de aminoácidos fuera de las regiones CDR dentro de la región variable de un anticuerpo. Una región marco variable es generalmente una secuencia de aminoácidos discontinuos de entre alrededor de 100-120 aminoácidos de longitud pero se pretende que haga referencia únicamente a aquellos aminoácidos fuera de las CDR. Tal como se usa en la presente descripción, se pretende que el término "región marco" signifique cada dominio del marco que está separado por las CDR.

25 Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en la presente descripción generalmente para hacer referencia a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o total de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se usa en la presente, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad o síntoma en un mamífero e incluye: (a) prevenir la enfermedad o síntoma de en un sujeto que puede estar predisposto a contraer la enfermedad o síntoma pero que no ha sido diagnosticado aún; (b) inhibir la enfermedad o síntoma, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, ocasionar el retroceso de la enfermedad. El agente terapéutico puede administrarse antes, durante o de forma posterior al comienzo de la enfermedad o lesión. Es de interés particular el tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos no deseables del paciente. Dicho tratamiento es conveniente llevarlo a cabo, preferentemente, antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. La terapia en cuestión se administrará, convenientemente, durante la etapa sintomática de la enfermedad y, en algunos casos, luego de la etapa sintomática de la enfermedad.

30 40 45 Los términos "individuo", "sujeto", "hospedador" y "paciente" se usan de forma intercambiable en la presente descripción y hacen referencia a cualquier sujeto mamífero para el cual se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratas; ratones), lagomorfos (por ejemplo, conejos), ungulados (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, cabras, y similares), etc.

50 Antes de describir la presente invención en mayor detalle, se deberá entender que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas, ya que estas pueden evidentemente variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no pretende ser taxativa, dado que la presente invención es la expuesta en las reivindicaciones adjuntas.

55 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta una décima parte de la unidad del límite inferior, salvo que el contexto claramente lo indique de cualquier otra manera, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor intermedio o establecido en ese intervalo indicado, se encuentra comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños 60 pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños y también están comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyan cualesquiera o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

65 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Si bien en la práctica o la evaluación de la presente invención también puede usarse cualquier

método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Debe observarse que tal como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen los referentes plurales salvo que se exprese claramente de cualquier otra manera en el contexto. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido de IL-2 variante" incluye una pluralidad de dichos polipéptidos y la referencia al "polipéptido de cadena pesada de HLA clase I" incluye la referencia a uno o más polipéptidos de cadena pesada de HLA clase I y equivalentes de estos conocidos para los expertos en la técnica, etcétera. Se observa, además, que las reivindicaciones pueden estar redactadas de forma que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, esto pretende ser una base antecedente para usar la terminología exclusiva tal como "solamente", "únicamente" y similares en relación con la enumeración de los elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación "negativa".

Se aprecia que determinadas características de la invención que se describen, por motivos de claridad, en el contexto de modalidades independientes, también se pueden proporcionar en combinación en una sola modalidad. Por el contrario, también pueden proporcionarse diversas características de la invención que, por motivos de brevedad, se describen en el contexto de una sola modalidad, de forma separada o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las modalidades que pertenecen a la invención se encuentran específicamente comprendidas en la presente invención y se describen en la presente descripción como si cada combinación se describiera de forma individual y explícita. Además, todas las subcombinaciones de las varias modalidades y elementos de estas también se encuentran específicamente comprendidas dentro de la presente invención y se describen en la presente descripción como si cada dicha subcombinación estuviese individual y específicamente descrita en la presente descripción.

Las publicaciones que se analizan en la presente descripción se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Ningún contenido en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden no coincidir con las fechas de publicación reales, las que puede ser necesario confirmar independientemente.

30 Descripción detallada

La presente descripción describe métodos de tratamiento que comprenden administrar a un individuo que lo necesita un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T (un polipéptido multimérico "synTac") y al menos un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el al menos un agente terapéutico adicional es un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo específico para el punto de control inmunitario. La presente descripción describe métodos que comprenden administrar un polipéptido multimérico (synTac) y un inhibidor de punto de control inmunitario a un individuo. La presente descripción describe métodos que comprenden administrar un polipéptido multimérico (synTac) a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con un inhibidor de punto de control inmunitario. La invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas proporciona una composición que comprende un polipéptido multimérico para el uso en un método para tratar un cáncer asociado a HPV en un paciente humano, el método comprende administrar un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario,

45 en donde el polipéptido multimérico comprende un heterodímero que tiene:

a) un primer polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:

- i) un epítopo de HPV16 E7 que comprende la secuencia de aminoácidos YMQLDLQPETT (SEQ ID NO:77);
- ii) un primer polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que es un polipéptido β2-microglobulina (β2M) que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 34A (SEQ ID NO:48); y

50 b) un segundo polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:

- i) un polipéptido de IL-2 variante, que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B (SEQ ID NO: 49);
- ii) un segundo polipéptido de MHC que es un polipéptido de cadena pesada de MHC clase I que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C (SEQ ID NO:50); y
- iii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig).

60 Un "polipéptido multimérico modulador de linfocitos T" también se denomina en la presente descripción como un "polipéptido synTac" o un "polipéptido multimérico synTac" o simplemente "synTac." Un polipéptido synTac comprende un dominio modulador. En algunos casos, el dominio modulador comprende una secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se encuentra en un polipéptido modulador de origen natural. En algunos casos, el dominio modulador es una variante de dominio modulador, donde la variante de dominio modulador exhibe una afinidad de unión reducida a un polipéptido inmunomodulador, en

comparación con la afinidad de un dominio modulador de tipo salvaje por el polipéptido inmunomodulador. Un polipéptido de synTac puede modular la actividad de un linfocito T diana. Un polipéptido synTac que comprende una variante de dominio modulador proporciona una especificidad de célula diana mejorada.

- 5 En algunos casos, un método de tratamiento de la presente descripción comprende administrar a un individuo que lo necesita un synTac y un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, el synTac y el inhibidor de punto de control inmunitario proporcionan efectos sinérgicos, en comparación con el/los efecto(s) del synTac cuando se administran solos (en monoterapia) o el inhibidor de punto de control inmunitario solo (en monoterapia).
- 10 La combinación de un inhibidor de punto de control inmunitario y un synTac es en algunos casos más efectivo que los efectos aditivos del synTac administrado como monoterapia o el inhibidor de punto de control inmunitario administrado como monoterapia. Por ejemplo, en algunos casos, un efecto sinérgico de un synTac y un inhibidor de punto de control inmunitario permite el uso de dosificaciones más bajas del synTac o del inhibidor de punto de control inmunitario y/o la administración menos frecuente del synTac o del inhibidor de punto de control inmunitario a un individuo que lo necesita. La capacidad de utilizar dosificaciones más bajas de agentes terapéuticos (un inhibidor de punto de control inmunitario o synTac) y/o administrar tales agentes con menos frecuencia puede reducir la toxicidad u otros efectos secundarios adversos que pueden asociarse con la administración del agente terapéutico en monoterapia, sin reducir la eficacia del agente terapéutico en un tratamiento. Además, un efecto sinérgico de un inhibidor de punto de control inmunitario y synTac puede dar como resultado en un mayor beneficio clínico, en comparación con el beneficio clínico obtenido con la monoterapia con synTac o con un inhibidor de punto de control inmunitario en monoterapia. Los ejemplos de beneficio clínico incluyen, por ejemplo, reducción de la masa tumoral en un individuo; reducción del número de células cancerosas en un individuo; aumento del tiempo de supervivencia del individuo; aumento del tiempo de remisión; y similares. Finalmente, un efecto sinérgico de un inhibidor de punto de control inmunitario y synTac puede reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con la monoterapia con synTac o la monoterapia con el inhibidor de punto de control inmunitario.
- 15
- 20
- 25

Inhibidores de puntos de control inmunitarios

30 Los inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos incluyen inhibidores que se dirigen a polipéptidos de puntos de control inmunitarios tales como CD27, CD28, CD40, CD122, CD96, CD73, CD47, OX40, GITR, CSF1R, JAK, PI3K delta, PI3K gamma, TAM, arginasa, CD137 (también conocida como 4-1BB), ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG3, TIM3, VISTA, CD96, TIGIT, CD122, PD-1, PD-L1 y PD-L2. En algunos casos, el polipéptido de punto de control inmunitario es una molécula de punto de control estimulador seleccionada de CD27, CD28, CD40, ICOS, OX40, GITR, CD122 y CD137. En algunos casos, el polipéptido del punto de control inmunitario es una molécula de punto de control inhibidora seleccionada de A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, TIM3, CD96, TIGIT y VISTA.

40 En algunos casos, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario se humaniza o desinmuniza de manera que el anticuerpo no induce sustancialmente una respuesta inmunitaria en un ser humano. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal desinmunizado. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal completamente humano. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario inhibe la unión del polipéptido del punto de control inmunitario a un ligando para el polipéptido del punto de control inmunitario. En algunos casos, el anticuerpo contra punto de control inmunitario inhibe la unión del polipéptido del punto de control inmunitario a un receptor para el polipéptido del punto de control inmunitario.

45

50 Los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que son específicos para los puntos de control inmunitarios y que funcionan como inhibidores de puntos de control inmunitarios, se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Wurz y otros (2016) *Ther. Adv. Med. Oncol.* 8:4; y Naidoo y otros (2015) *Ann. Oncol.* 26:2375.

55 Los anticuerpos contra punto de control inmunitario adecuados incluyen, de modo no limitante, nivolumab (Bristol-Myers Squibb), pembrolizumab (Merck), pidilizumab (Curetech), AMP-224 (GlaxoSmithKline/Amplimmune), MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Medarex, Inc./Bristol Myers Squibb), MEDI-4736 (MedImmune/AstraZeneca), arelumab (Merck Serono), ipilimumab (YERVOY, (Bristol-Myers Squibb), (Pfizer), pidilizumab (CureTech, Ltd.), IMP321 (Immutep S.A.), MGA271 (Macrogenics), BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), lirilumab (Bristol-Myers Squibb), urelumab (Bristol-Myers Squibb), PF-05082566 (Pfizer), IPH2101 (Innate Pharma/Bristol-Myers Squibb), MEDI-6469 (MedImmune/AZ), CP-870,893 (Genentech), Mogamulizumab (Kyowa Hakko Kirin), Varlilumab (CellDex Therapeutics), Avelumab (EMD Serono), Galiximab (Biogen Idee), AMP-514 (Amplimmune/AZ), AUNP 12 (Aurigene y Pierre Fabre), Indoximod (NewLink Genetics), NLG-919 (NewLink Genetics), INCB024360 (Incyte); KN035; y sus combinaciones.

60

65 Los anticuerpos anti-LAG3 adecuados incluyen, por ejemplo, BMS-986016 y LAG525. Los anticuerpos anti-GITR adecuados incluyen, por ejemplo, TRX518, MK-4166, INCAGN01876 y MK-1248. Los anticuerpos anti-OX40

adequados incluyen, por ejemplo, MEDI0562, INCAGN01949, GSK2831781, GSK-3174998, MOXR-0916, PF-04518600 y LAG525. Los anticuerpos anti-VISTA adecuados se proporcionan en, por ejemplo, el documento WO 2015/097536.

- 5 Una dosificación adecuada de un anticuerpo contra punto de control inmunitario es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2400 mg/kg por día, tal como de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1200 mg/kg por día, que incluye de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 1200 mg/kg por día. Otras dosificaciones representativas de tales agentes incluyen alrededor de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg, 700 mg/kg, 800 mg/kg, 900 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg, 2000 mg/kg, 2100 mg/kg, 2200 mg/kg, y 2300 mg/kg al día. La dosis efectiva del anticuerpo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos adecuados a lo largo del día.

15 Anticuerpos anti-PD-1

En algunos casos, un inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-1.

- 20 Los anticuerpos anti-PD-1 adecuados incluyen, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab (también conocido como MK-3475), pidilizumab, SHR-1210, PDR001 y AMP-224. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal anti-PD-1 es nivolumab, pembrolizumab o PDR001. Los anticuerpos anti-PD1 adecuados se describen en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2017/0044259. Para pidilizumab, ver, por ejemplo, Rosenblatt y otros (2011) *J. Immunother.* 34:409-18.

- 25 En algunos casos, el anticuerpo anti-PD1 es pembrolizumab. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de pembrolizumab es:

30 QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWWRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNR
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALVQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
35 HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:51). La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) está subrayada.

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de pembrolizumab es:

40 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVPARFSGSGS
GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPTKSFNRGE
C (SEQ ID NO:52). La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) está subrayada.

- 45 En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las regiones VH y VL de pembrolizumab. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera de pembrolizumab.

- 50 En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (también conocido como MDX-1106 o BMS-936558; ver, por ejemplo, Topalian y otros (2012) *N. Eng. J. Med.* 366:2443-2454; y la patente de Estados Unidos núm. 8,008,449). La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de nivolumab es:

55 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWQGQTLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPALVQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:53).

- 60 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de nivolumab es:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISSE
PEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54).

- 65 En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera de nivolumab.

Anticuerpos anti-CTLA4

En algunos casos, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab. Para tremelimumab, ver, por ejemplo, Ribas y otros (2013) *J. Clin. Oncol.* 31:616-22.

- 5 En algunos casos, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de ipilimumab es:

10 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTIFISYDGNNKYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKD YFPEPVTVWSN SGA LTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCP CPCAPELLGGPSVFLFP PKD TL MISRTPEVTCVV DVSHEDPEV KFNWYV DGVEV
HNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDE
15 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:55). La secuencia de aminoácidos de la región VH está subrayada.

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de ipilimumab es:

20 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQS VGVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGT
DFTL TIS RLE PEDFAVYYCQQY GS SPWT FGQ GKTVEIKR TVAAPS VFIFPPS D EQLKSGT ASV VCL NN FYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLS S STL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGE C
(SEQ ID NO:56). La secuencia de aminoácidos de la región VL está subrayada.

- 25 En algunos casos, el anticuerpo anti-CTLA4 comprende las regiones VH y VL de ipilimumab. En algunos casos, el anticuerpo anti-CTLA4 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera de ipilimumab.

Anticuerpos anti-PD-L1

- 30 En algunos casos, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 es BMS-935559, MEDI4736, MPDL3280A (también conocido como RG7446), KN035 o MSB0010718C. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 es MPDL3280A (atezolizumab) o MEDI4736 (durvalumab). Para durvalumab, ver, por ejemplo, el documento WO 2011/066389. Para atezolizumab, ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 8,217,149.

- 35 En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de atezolizumab es:

40 EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTI
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT A
ALGCLVKD YFPEPVTVWSN SGA LTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVD K
KVEPKSCDKTHTCP CPCAPELLGGPSVFLFP PKD TL MISRTPEVTCVV DVSHEDPEV KFNWYV DGVEV H
NAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEM T
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:57).

- 45 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de atezolizumab es:

50 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTA WA WYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSGSGTD
FTLT ISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGKTVEIKR TVAAPS VFIFPPS D EQLKSGT ASV VCL NN FYPRE
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLS S STL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGE C
(SEQ ID NO:58).

- 55 En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera de atezolizumab. En algunos casos, el anticuerpo anti-PDL1 es KN035, un anticuerpo de dominio único anti-PD-L1 completamente humanizado fusionado a un polipéptido Fc de IgG1 humano. Zhang y otros (2017) *Cell Discov.* 3:17004; y el documento WO 2017/020801. La porción de anticuerpo de un solo dominio de KN035 puede comprender la secuencia de aminoácidos:

60 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCM AWFRQAPGKERERVAKL LTTSGSTYLA DSVKGRFTIS
QNNAKSTVYLQMNSLKPEDTAM YYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVS (SEQ ID NO:216),

donde los aminoácidos subrayados son las CDR1, CDR2 y CDR3.

Polipéptidos multiméricos moduladores de linfocitos T (SYNTAC)

- 65

Los polipéptidos multiméricos (por ejemplo, heterodiméricos, heterotriméricos) se describen más abajo. Los polipéptidos multiméricos son polipéptidos moduladores de linfocitos T, y también se denominan en la presente descripción "polipéptidos multiméricos moduladores de linfocitos T" o "synTac" (para "sinapsis inmunológica para la activación de linfocitos T"). El polipéptido multimérico para el uso de acuerdo con la invención comprende un heterodímero que tiene:

5 a) un primer polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:

- 10 i) un epítopo de HPV16 E7 que comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPETT (SEQ ID NO:77);
ii) un primer polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que es un polipéptido β 2-microglobulina (β 2M) que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 34A (SEQ ID NO:48); y

15 b) un segundo polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:

- 20 i) un polipéptido de IL-2 variante, que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B (SEQ ID NO: 49);
ii) un segundo polipéptido de MHC que es un polipéptido de cadena pesada de MHC clase I que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C (SEQ ID NO:50); y
iii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig).

Un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T en general comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N al extremo C: i) un epítopo; ii) un primer polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N al extremo C: i) un segundo polipéptido de MHC; y ii) opcionalmente un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig) o una estructura que no sea Ig, donde el polipéptido multimérico comprende uno o más dominios inmunomoduladores ("MOD"), en donde el uno o más dominios inmunomoduladores está: A) en el extremo C-terminal del primer polipéptido; B) en el extremo N-terminal del segundo polipéptido; C) en el extremo C-terminal del segundo polipéptido; o D) en el extremo C-terminal del primer polipéptido y en el extremo N-terminal del segundo polipéptido. En algunos casos, un polipéptido multimérico de linfocitos T comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; ii) un primer polipéptido de MHC; y iii) un dominio inmunomodulador; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC; ii) un polipéptido de Fc de Ig. En algunos casos, un polipéptido multimérico de linfocitos T comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC; ii) un polipéptido de Fc de Ig; iii) un dominio inmunomodulador ("MOD"). En algunos casos, un polipéptido multimérico de linfocitos T comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC; y ii) un dominio inmunomodulador. En algunos casos, un polipéptido multimérico de linfocitos T comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador; ii) un segundo polipéptido de MHC. En algunos casos, un polipéptido multimérico de linfocitos T comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC; y iii) un dominio inmunomodulador y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC.

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende una estructura que no es Ig. Por ejemplo, en algunos casos, la estructura que no es Ig es un polipéptido XTEN, un polipéptido transferrina, un polipéptido receptor Fc, un polipéptido similar a la elastina, un polipéptido similar a la seda o un polipéptido similar a la seda-elastina.

55 En algunos casos, el primer polipéptido de MHC es un polipéptido de β 2-microglobulina (β 2M) y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido de cadena pesada de MHC clase I. Un polipéptido de β 2M adecuado comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de β 2M representada en la Figura 6. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada de MHC clase I es una cadena pesada HLA-A, una HLA-B o una HLA-C. En algunos casos, el polipéptido de cadena pesada de MHC clase I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las Figura 5A-5C. En algunos casos, el primer polipéptido de MHC es un polipéptido de cadena alfa de MHC clase II; y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido de cadena beta de MHC clase II.

El epítopo presente en un polipéptido multimérico puede ser un epítopo de linfocitos T.

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende un polipéptido Fc de Ig. En algunos casos, el polipéptido de Fc de Ig es un polipéptido de Fc de IgG1, un polipéptido de Fc de IgG2, un polipéptido de Fc de IgG3, un polipéptido de Fc de IgG4, un polipéptido de Fc de IgA o un polipéptido de Fc de IgM. En algunos casos, un polipéptido de Fc de Ig comprende una secuencia de aminoácidos que tiene, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de representada en las Figura 4A-4C.

- 10 El primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico pueden asociarse no covalentemente. El primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico pueden unirse covalentemente. El primer polipéptido y el segundo polipéptido de un polipéptido multimérico pueden unirse covalentemente, donde el enlace covalente es a través de un enlace disulfuro. En algunos casos, primer polipéptido de MHC o un enlazador entre el epítopo y el primer polipéptido de MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un primer residuo Cys y el segundo polipéptido de MHC comprende una sustitución de aminoácidos para proporcionar un segundo residuo Cys, y en donde el enlace disulfuro es entre el primer y el segundo residuos de Cys.
- 15

Un polipéptido multimérico puede incluir un enlazador entre uno o más de: el epítopo y el primer polipéptido de MHC; dos copias del polipéptido inmunomodulador ("MOD"); el polipéptido inmunomodulador y el segundo polipéptido de MHC; y el segundo polipéptido de MHC y el polipéptido Fc de Ig.

20 Los polipéptidos inmunomoduladores adecuados para la inclusión en un polipéptido multimérico de linfocitos T incluyen, de modo no limitante, un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido B7-1; un polipéptido B7-2, un polipéptido ICOS-L, un polipéptido OX-40L, un polipéptido CD80, un polipéptido CD86, un polipéptido IL-2, un polipéptido PD-1, un polipéptido FasL y un polipéptido PD-L2.

25 Un polipéptido multimérico puede incluir 2 o más polipéptidos inmunomoduladores. Un polipéptido multimérico puede incluir 2 polipéptidos inmunomoduladores. En algunos casos, los 2 polipéptidos inmunomoduladores están en tandem. Un polipéptido multimérico puede incluir 3 polipéptidos inmunomoduladores. En algunos casos, los 3 polipéptidos inmunomoduladores están en tandem.

30 Un polipéptido multimérico puede comprender un tercer polipéptido, donde el tercer polipéptido comprende un polipéptido inmunomodulador que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido inmunomodulador del primer polipéptido o el segundo polipéptido.

35 En algunos casos, el tercer polipéptido se une covalentemente al primer polipéptido.

Los ejemplos de polipéptidos multiméricos adecuados se describen en los documentos WO 2017/151940; WO 2017/201210; y PCT/US2017/067663.

40 Polipéptidos de MHC

Como se indicó anteriormente, un polipéptido multimérico de la presente descripción incluye polipéptidos de MHC. Para los propósitos de la presente descripción, el término "polipéptidos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)" pretende incluir polipéptidos MHC de diversas especies, que incluyen polipéptidos MHC humanos (también denominados polipéptidos de antígeno de leucocitos humanos (HLA)), polipéptidos de MHC de roedores (por ejemplo, ratón, rata, etc.) y polipéptidos de MHC de otras especies de mamíferos (por ejemplo, lagomorfos, primates no humanos, caninos, felinitos, ungulados (por ejemplo, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, etc.), y similares. El término "polipéptido de MHC" pretende incluir polipéptidos de MHC clase I (por ejemplo, β2 microglobulina y cadena pesada de MHC clase I) y polipéptidos de MHC clase II (por ejemplo, polipéptido de MHC clase II α y polipéptido de MHC clase II β).

Como se indicó anteriormente, en algunos polipéptidos multiméricos de la presente descripción, el primer y el segundo polipéptido de MHC son polipéptidos de MHC clase I; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido de MHC es un polipéptido de β2 microglobulina (β2M) de MHC clase I y el segundo polipéptido de MHC es una cadena pesada (cadena H) de MHC clase I. En otros casos, el primer y el segundo polipéptidos de MHC son polipéptidos de MHC clase II; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido de MHC es un polipéptido de MHC clase II de cadena α, y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido de MHC clase II de cadena β. En otros casos, el primer polipéptido es un polipéptido de MHC clase II de cadena β, y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido de MHC clase II de cadena α.

60 En algunos casos, un polipéptido de MHC de un polipéptido multimérico de la presente descripción es un polipéptido de MHC humano, donde los polipéptidos de MHC humanos también se denominan polipéptidos del "antígeno leucocitario humano" ("HLA"). En algunos casos, un polipéptido de MHC de un polipéptido multimérico de la presente descripción es un polipéptido HLA clase I, por ejemplo, un polipéptido β2-microglobulina, o un polipéptido de cadena pesada de HLA clase I. Los polipéptidos de cadena pesada de HLA clase I incluyen polipéptidos de cadena pesada HLA-A, polipéptidos de cadena pesada HLA-B, polipéptidos de cadena pesada HLA-C, polipéptidos de cadena

pesada HLA-E, polipéptidos de cadena pesada HLA-F y polipéptidos de cadena pesada HLA-G. En algunos casos, un polipéptido de MHC de un polipéptido multimérico de la presente descripción es un polipéptido de HLA clase II, por ejemplo, una cadena HLA α de clase II o una cadena HLA β de clase II. Los polipéptidos de MHC clase II incluyen polipéptidos del MHC clase II DP α y β , polipéptidos DM α y β , polipéptidos DOA α y β , polipéptidos DOB α y β , polipéptidos DQ α y β y polipéptidos DR α y β .

5 HLA-A (Y84A; A236C)

El polipéptido de cadena pesada de MHC clase I comprende las sustituciones Y84A y A236C. Por ejemplo, en 10 algunos casos, el polipéptido de cadena pesada de MHC clase I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de HLA-A humana siguiente (Y84A; A236C):

15 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAH
SQTHRVDLGLTRGLRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLSWTAADMAA
QTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPA
EITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPC~~G~~DGTFKWA~~V~~VPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTRWEP (SEQ ID
NO:50),

20 donde el aminoácido 84 es Ala y el aminoácido 236 es Cys. En algunos casos, el Cys-236 forma un puente disulfuro intercatenario con Cys-12 de un polipéptido de β 2M variante que comprende una sustitución R12C.

En algunos casos, un polipéptido de β 2M comprende la secuencia de aminoácidos:

25 IQRTPKIQVY S~~C~~H~~P~~AENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF
TPTEKDEYAC RVNHVTLSQP KIVKWDRDM (SEQ ID NO:48).

En algunos casos, un polipéptido de cadena pesada de HLA clase I comprende la secuencia de aminoácidos:

30 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAH
SQTHRVDLGLTRGLRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLSWTAADMAA
QTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPA
EITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPC~~G~~DGTFKWA~~V~~VPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTRWEP (SEQ ID
NO:50).

35 En algunos casos, el polipéptido de β 2M comprende la secuencia de aminoácidos:

40 IQRTPKIQVY S~~C~~H~~P~~AENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFSKDW~~S~~FYLLYYTEFTPT
KDEYACRVNHVTLSQP~~K~~IVKWDRDM (SEQ ID NO:48).

Polipéptidos estructurales

Un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T comprende un polipéptido de Fc.

45 Polipéptidos de Fc

En algunos casos, la primera y/o segunda cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico comprende un polipéptido de Fc. El polipéptido Fc de un polipéptido multimérico puede ser un Fc de IgG1 humana, un Fc de IgG2 humana, un Fc de IgG3 humana, un Fc de IgG4 humana, etc. En algunos casos, el polipéptido de Fc comprende 50 una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de una región Fc representada en las Figuras 4A-C. En algunos casos, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el 55 polipéptido de Fc de IgG1 humana representada en la Figura 4A. En algunos casos, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el 60 polipéptido de Fc de IgG1 humana representada en la Figura 4A; y comprende una sustitución de N77; por ejemplo, el polipéptido de Fc comprende una sustitución N77A. En algunos casos, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos 65 alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de Fc de IgG2 humana representada en la Figura 4A; por ejemplo, el polipéptido de Fc comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 99-325 del polipéptido de Fc de IgG2 humana representada en la Figura 4A. En algunos casos, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de Fc de IgG3 humana representada en la Figura 4A; por ejemplo, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 19-246 del polipéptido de Fc de IgG3 humana representada en la Figura 4A. En algunos casos, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de Fc de IgM humana representada en la Figura 4B; por ejemplo, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1-276 del polipéptido de Fc de IgM humana representada en la Figura 4B. En algunos casos, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de Fc de IgA humana representada en la Figura 4C; por ejemplo, el polipéptido de Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1-234 del polipéptido de Fc de IgA humana representada en la Figura 4C.

En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana). En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana), excepto por una sustitución de N297 con un aminoácido distinto a asparagina. En algunos casos, el polipéptido Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33C (Fc de IgG1 humana que comprende una sustitución N297A). En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana), excepto para una sustitución L234 con un aminoácido distinto a leucina. En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana), excepto para una sustitución L235 con un aminoácido distinto a leucina. En algunos casos, el polipéptido Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33D (Fc de IgG1 humana que comprende una sustitución L234A y una sustitución L235A). En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana), excepto para una sustitución de P331S con un aminoácido distinto a prolina; en algunos casos, la sustitución es una sustitución P331S. En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana), excepto por las sustituciones en L234 y L235 con aminoácidos distintos a leucina. En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (Fc de IgG1 humana), excepto por sustituciones en L234 y L235 con aminoácidos distintos de leucina, y una sustitución de P331 con un aminoácido distinto a prolina. En algunos casos, el polipéptido Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33B (Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones L234F, L235E y P331S). En algunos casos, el polipéptido de Fc presente en un polipéptido multimérico es un polipéptido de Fc IgG1 que comprende las sustituciones L234A y L235A.

Enlazadores

60 Un polipéptido multimérico puede incluir péptidos enlazadores interpuestos entre, por ejemplo, un epítopo y un polipéptido de MHC; entre un polipéptido de MHC y un polipéptido inmunomodulador; entre un polipéptido de MHC y un polipéptido de Fc de Ig; entre un primer polipéptido inmunomodulador y un segundo polipéptido inmunomodulador; o entre un segundo polipéptido inmunomodulador y un tercer polipéptido inmunomodulador.

65 Por ejemplo, un polipéptido multimérico puede incluir péptidos enlazadores interpuestos entre, por ejemplo, un epitopo y un polipéptido de MHC; entre un polipéptido de MHC y un polipéptido inmunomodulador; entre un

polipéptido de MHC y un polipéptido de Fc de Ig; entre un primer polipéptido de IL-2 variante y un segundo polipéptido de IL-2 variante; o entre un segundo polipéptido de IL-2 variante y un tercer polipéptido de IL-2 variante. Como otro ejemplo, un polipéptido multimérico puede incluir péptidos enlazadores interpuestos entre, por ejemplo, un epítopo y un polipéptido de MHC; entre un polipéptido de MHC y un polipéptido inmunomodulador; entre un polipéptido de MHC y un polipéptido de Fc de Ig; entre un primer polipéptido de 4-1BBL variante y un segundo polipéptido de 4-1BBL variante; o entre un segundo polipéptido de 4-1BBL variante y un tercer polipéptido de 4-1BBL variante.

Los enlazadores adecuados (a los que también se hace referencia como "separadores") se pueden seleccionar fácilmente y pueden tener cualquiera de una cantidad de longitudes adecuadas, tal como de 1 aminoácido a 25 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, lo que incluye de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos. Un enlazador adecuado puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

Los enlazadores ilustrativos incluyen polímeros de glicina (G_n), polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:210) y $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:211), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Pueden usarse polímeros de glicina y glicina-serina; ambos, Gly y Ser, son relativamente no estructurados y, por lo tanto, pueden funcionar como una ligadura neutra entre componentes. Pueden usarse polímeros de glicina; la glicina accede al espacio phi-psi de forma más significativa incluso que la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)).

Las porciones enlazadoras ilustrativas pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, de modo no limitante, GGSG (SEQ ID NO:65), GGSGG (SEQ ID NO:66), GSGSG (SEQ ID NO:67), GSAGG (SEQ ID NO:68), GGGSG (SEQ ID NO:69), GSAGG (SEQ ID NO:70), y similares. Los enlazadores ilustrativos pueden incluir, por ejemplo, Gly(Ser_n)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GSSSS)_n (SEQ ID NO:71), donde n es 4. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GSSSS)_n (SEQ ID NO:72), donde n es 5. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GGGGS)_n (SEQ ID NO:205), donde n es 1. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GGGGS)_n (SEQ ID NO:206), donde n es 2. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GGGGS)_n (SEQ ID NO:207), donde n es 3. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GGGGS)_n (SEQ ID NO:208), donde n es 4. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos (GGGGS)_n (SEQ ID NO:209), donde n es 5. En algunos casos, un enlazador comprende la secuencia de aminoácidos AAAGG (SEQ ID NO:73).

En algunos casos, un polipéptido enlazador, presente en un primer polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente descripción, incluye un residuo de cisteína que puede formar un puente disulfuro con un residuo de cisteína presente en un segundo polipéptido de un polipéptido multimérico de la presente descripción. En algunos casos, por ejemplo, un enlazador adecuado comprende la secuencia de aminoácidos GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:74).

Epítopos

Un epítopo presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción se une específicamente a un linfocito T, es decir, el epítopo se une específicamente a un linfocito T específico para el epítopo. Un linfocito T específico para el epítopo se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos de referencia, pero no se une sustancialmente a un epítopo que difiere de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, un linfocito T específico para el epítopo se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos de referencia, y se une a un epítopo que difiere de la secuencia de aminoácidos de referencia, si es que lo hace, con una afinidad menor que 10^{-6} M, menor que 10^{-5} M o menor que 10^{-4} M. Un linfocito T específico para el epítopo se puede unir a un epítopo del cual es específico con una afinidad de al menos 10^{-7} M, al menos 10^{-8} M, al menos 10^{-9} M o al menos 10^{-10} M.

El epítopo es HPV16E7/11-20 (YMLDLQPETT; SEQ ID NO:77).

Polipéptidos inmunomoduladores

Los polipéptidos inmunomoduladores adecuados incluyen un polipéptido IL-2.

En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador presente en un synTac exhibe una afinidad de unión reducida a un polipéptido coimmunomodulador cognado expresado en la superficie de un linfocito T, en comparación con la afinidad de unión de un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje para el mismo polipéptido coimmunomodulador cognado. En algunos casos, donde un synTac comprende un polipéptido inmunomodulador de afinidad reducida, el polipéptido synTac exhibe una unión reducida a un polipéptido coimmunomodulador cognado expresado en la superficie de un linfocito T. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido synTac que comprende un polipéptido inmunomodulador con afinidad reducida se une a un polipéptido coimmunomodulador cognado con una afinidad de

unión que es al menos 10 % menor, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 % al menos 30 %, al menos 35 % al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % menor, al menos 55 % menor, al menos 60 % menor, al menos 65 % menor, al menos 70 % menor, al menos 75 % menor, al menos 80 % menor, al menos 85 % menor, al menos 90 % menor, al menos 95 % menor, o más del 95 % menor, que la afinidad de unión de un polipéptido synTac de control que comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje por el mismo polipéptido coimmunomodulador cognado.

Determinación de la afinidad de unión

- 10 Es posible determinar la afinidad de unión entre un polipéptido inmunomodulador y su polipéptido coimmunomodulador cognado mediante interferometría de biocapa (BLI) mediante el uso del polipéptido inmunomodulador purificado y el polipéptido coimmunomodulador cognado purificado. La afinidad de unión entre un synTac de la presente descripción y su polipéptido coimmunomodulador cognado también se puede determinar mediante BLI mediante el uso de synTac purificado y el polipéptido coimmunomodulador cognado. Los métodos de BLI se conocen bien para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Lad y otros (2015) *J. Biomol. Screen.* 20(4):498-507; y Shah y Duncan (2014) *J. Vis. Exp.* 18:e51383. Las afinidades de unión específicas y relativas descritas en esta descripción entre un polipéptido inmunomodulador y su polipéptido coimmunomodulador cognado, o entre un synTac y su polipéptido coimmunomodulador cognado, se pueden determinar mediante el uso de los siguientes procedimientos.
- 20 Para determinar la afinidad de unión entre un synTac de la presente descripción y su polipéptido coimmunomodulador cognado, se puede llevar a cabo un ensayo de BLI mediante el uso de un instrumento Octet RED 96 (Pal FortéBio) o un instrumento similar, de la manera que sigue a continuación. Para determinar la afinidad de unión de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T (por ejemplo, un synTac de la presente descripción; o un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de control (donde un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de control comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje)), el polipéptido multimérico modulador de linfocitos T se inmoviliza en un soporte insoluble (un "biosensor"). El polipéptido multimérico modulador de linfocitos T inmovilizado es la "diana." La inmovilización se puede llevar a cabo al inmovilizar un anticuerpo de captura en el soporte insoluble, donde el anticuerpo de captura inmoviliza el polipéptido multimérico modulador de linfocitos T. Por ejemplo, la inmovilización puede realizarse inmovilizando anticuerpos anti-Fc (por ejemplo, anti-Fc de IgG humana) sobre el soporte insoluble, donde los anticuerpos anti-Fc inmovilizados se unen e inmovilizan el polipéptido multimérico modulador de linfocitos T (donde el polipéptido multimérico modulador de linfocitos T comprende un polipéptido Fc de Ig). Se aplica un polipéptido coimmunomodulador, en varias concentraciones diferentes, al polipéptido multimérico modulador de linfocitos T inmovilizado, y se registra la respuesta del instrumento. Los ensayos se llevan a cabo en un medio líquido que comprende HEPES 25mM, pH 6,8, poli(etylenglicol) 6000 al 5 %, KCl 50 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 % y detergente no iónico Tween 20 al 0,02 %. La unión del polipéptido coimmunomodulador al polipéptido multimérico modulador de linfocitos T inmovilizado se lleva a cabo a 30 °C. Como control positivo para la afinidad de unión, puede usarse un anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo monoclonal anti-HLA clase I W6/32 (Colección americana de cultivos tipo núm. HB-95; Parham y otros (1979) *J. Immunol.* 123:342), que tiene una K_D de 7 nM. Puede generarse una curva estándar mediante el uso de diluciones en serie del anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I. El polipéptido coimmunomodulador, o el AcM anti-MHC clase I, es el "analito." La BLI analiza el patrón de interferencia de luz blanca reflejada desde dos superficies: i) desde el polipéptido inmovilizado ("diana"); y ii) una capa de referencia interna. Un cambio en la cantidad de moléculas ("analito"; por ejemplo, polipéptido coimmunomodulador; anticuerpo anti-HLA) unido a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia; este cambio en el patrón de interferencia se puede medir en tiempo real. Los dos términos cinéticos que describen la afinidad de la interacción diana/analito son la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d). La relación de estos dos términos (k_d/k_a) da lugar a la constante de afinidad K_D .
- 50 Como se indicó anteriormente, la determinación de la afinidad de unión entre un polipéptido inmunomodulador (por ejemplo, IL-2 o una IL-2 variante) y su polipéptido coimmunomodulador cognado (por ejemplo, IL-2R) también se puede determinar mediante BLI. El ensayo es similar al descrito anteriormente para el polipéptido multimérico de synTac. Un ensayo de BLI se puede llevar a cabo mediante el uso de un instrumento Octet RED 96 (Pal FortéBio) o un instrumento similar, de la manera que sigue a continuación. Un polipéptido inmunomodulador componente de un synTac de la presente descripción (por ejemplo, un polipéptido de IL-2 variante de la presente descripción); y un polipéptido inmunomodulador de control (donde un polipéptido inmunomodulador de control comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje, por ejemplo, IL-2 de tipo salvaje)) se inmovilizan en un soporte insoluble (un "biosensor"). El polipéptido inmunomodulador es la "diana." La inmovilización se puede llevar a cabo al inmovilizar un anticuerpo de captura en el soporte insoluble, donde el anticuerpo de captura inmoviliza el polipéptido inmunomodulador. Por ejemplo, si la diana se fusiona a una etiqueta de inmunoafinidad (por ejemplo, FLAG, Fc de IgG humana), es posible llevar a cabo la inmovilización al inmovilizar con el anticuerpo apropiado la etiqueta de inmunoafinidad (por ejemplo, Fc de IgG antihumana) en el soporte insoluble, donde los anticuerpos inmovilizados se unen al polipéptido inmunomodulador (donde el polipéptido inmunomodulador comprende un polipéptido de Fc de Ig) y lo inmovilizan. Se aplica un polipéptido coimmunomodulador (o polipéptidos), en varias concentraciones diferentes, en el polipéptido inmunomodulador inmovilizado y se registra la respuesta del instrumento. Alternativamente, un polipéptido (o polipéptidos) coimmunomodulador se inmoviliza en el biosensor (por ejemplo, para el heterotímero del
- 55
- 60
- 65

receptor de IL-2, como una subunidad monomérica, subcomplejo heterodimérico o el heterotímero completo) y se aplica el polipéptido inmunomodulador, en diversas concentraciones diferentes, al(a los) polipéptido(s) coimmunomoduladore(s) inmovilizado(s), y se registra la respuesta del instrumento. Los ensayos se llevan a cabo en un medio líquido que comprende HEPES 25mM, pH 6,8, polietilenoglicol 6000 al 5 %, KCl 50 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 % y detergente no iónico Tween 20 al 0,02 %. La unión del polipéptido coimmunomodulador al polipéptido inmunomodulador inmovilizado se llevaron a cabo a 30 °C. Como control positivo para la afinidad de unión, puede usarse un anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo monoclonal anti-HLA clase I W6/32 (Colección americana de cultivos tipo núm. HB-95; Parham y otros (1979) *J. Immunol.* 123:342), que tiene una K_D de 7 nM. Puede generarse una curva estándar mediante el uso de diluciones en serie del anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I. El polipéptido coimmunomodulador, o el AcM anti-MHC clase I, es el "analito." La BLI analiza el patrón de interferencia de luz blanca reflejada desde dos superficies: i) desde el polipéptido inmovilizado ("diana"); y ii) una capa de referencia interna. Un cambio en la cantidad de moléculas ("analito"; por ejemplo, polipéptido coimmunomodulador; anticuerpo anti-HLA) unido a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia; este cambio en el patrón de interferencia se puede medir en tiempo real. Los dos términos cinéticos que describen la afinidad de la interacción diana/analito son la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d). La relación de estos dos términos (k_a/k_d) da lugar a la constante de afinidad K_D . La determinación de la afinidad de unión tanto de un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje (por ejemplo, IL-2) a su receptor (por ejemplo, IL-2R) como de un polipéptido inmunomodulador variante (por ejemplo, una IL-2 variante tal como se describe en la presente descripción) a su polipéptido coimmunomodulador cognado (por ejemplo, su receptor) (por ejemplo, IL-2R) permite por lo tanto determinar la afinidad de unión relativa del polipéptido coimmunomodulador variante, en comparación con el polipéptido coimmunomodulador de tipo salvaje, al polipéptido coimmunomodulador cognado. Es decir, se puede determinar si la afinidad de unión de un polipéptido inmunomodulador variante a su receptor (su polipéptido coimmunomodulador cognado) se reduce en comparación con la afinidad de unión del polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje al mismo polipéptido coimmunomodulador cognado y, de hacerlo, cuál es el porcentaje de reducción de la afinidad de unión del polipéptido coimmunomodulador de tipo salvaje.

El ensayo de BLI se lleva a cabo en una placa de varios pocillos. Para realizar el ensayo, se define la distribución de placas, se definen las etapas del ensayo y se asignan los biosensores en el software de adquisición de datos Octet. Se hidrata el ensamble del biosensor. El ensamble del biosensor hidratado y la placa de ensayo se equilibran durante 10 minutos en el instrumento Octet. Una vez que se adquieren los datos, se cargan los datos adquiridos en el software de análisis de datos Octet. Los datos se procesan en la ventana de Procesamiento mediante la especificación del método para la sustracción de referencia, alineación del eje y, corrección entre etapas y el filtro de Savitzky-Golay. Los datos se analizan en la ventana de Análisis mediante la especificación de etapas de análisis (asociación y disociación), selección del modelo de ajuste de curva (1:1), método de ajuste (global) y ventana de interés (en segundos). Se evalúa la calidad del ajuste. Los valores de K_D para cada traza de datos de (concentración de analito) se pueden promediar si se encuentran dentro de un intervalo de 3 veces. Los valores de error de K_D se deberían encontrar dentro de un orden de magnitud de los valores constantes de afinidad; los valores de R^2 se deberían encontrar por encima de 0,95. Ver, por ejemplo, Abdiche y otros (2008) *J. Anal. Biochem.* 377:209.

En algunos casos, la relación de: i) la afinidad de unión de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de control (donde el control comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje, por ejemplo, IL-2 de tipo salvaje) a un polipéptido coimmunomodulador cognado (por ejemplo, IL-2R) respecto a ii) la afinidad de unión de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de la presente descripción que comprende una variante del polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje (por ejemplo, IL-2 variante) respecto al polipéptido coimmunomodulador cognado (por ejemplo, IL-2R), cuando se mide mediante BLI (como se describió anteriormente), es al menos 1,5:1, al menos 2:1, al menos 5:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 50:1, al menos 100:1, al menos 500:1, al menos 10²:1, al menos 5 x 10²:1, al menos 10³:1, al menos 5 x 10³:1, al menos 10⁴:1, al menos 10⁵:1 o al menos 10⁶:1. En algunos casos, la relación de: i) la afinidad de unión de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de control (donde el control comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje) a un polipéptido coimmunomodulador cognado respecto a ii) la afinidad de unión de un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T de la presente descripción que comprende una variante del polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje con respecto al polipéptido coimmunomodulador cognado, cuando se mide mediante BLI, está en el intervalo de 1,5:1 a 10⁶:1, por ejemplo, de 1,5:1 a 10:1, de 10:1 a 50:1, de 50:1 a 10²:1, de 10²:1 a 10³:1, de 10³:1 a 10⁴:1, de 10⁴:1 a 10⁵:1 o de 10⁵:1 a 10⁶:1.

En algunos casos, la relación de: i) la afinidad de unión de un polipéptido inmunomodulador de control (donde el control comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje, por ejemplo, IL-2 de tipo salvaje) a un polipéptido coimmunomodulador cognado (por ejemplo, IL-2R) respecto a ii) la afinidad de unión de un polipéptido inmunomodulador de la presente descripción que comprende una variante del polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje (por ejemplo, IL-2 variante) respecto al polipéptido coimmunomodulador cognado (por ejemplo, IL-2R), cuando se mide mediante BLI (como se describió anteriormente), es al menos 1,5:1, al menos 2:1, al menos 5:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 50:1, al menos 100:1, al menos 500:1, al menos 10²:1, al menos 5 x 10²:1, al menos 10³:1, al menos 5 x 10³:1, al menos 10⁴:1, al menos 10⁵:1 o al menos 10⁶:1. En algunos casos, la relación de: i) la afinidad de unión de un polipéptido inmunomodulador de control (donde el control comprende un polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje) a un polipéptido coimmunomodulador cognado

respecto a ii) la afinidad de unión de un polipéptido inmunomodulador de la presente descripción que comprende una variante del polipéptido inmunomodulador de tipo salvaje al polipéptido coimmunomodulador cognado, cuando se mide mediante BLI, está en el intervalo de 1,5:1 a 10⁶:1, por ejemplo, de 1,5:1 a 10:1, de 10:1 a 50:1, de 50:1 a 10²:1, de 10²:1 a 10³:1, de 10³:1 a 10⁴:1, de 10⁴:1 a 10⁵:1 o de 10⁵:1 a 10⁶:1.

5 IL-2/synTac

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende un polipéptido de IL-2 variante como el dominio modulador que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B (SEQ ID NO. 49).

10 Un polipéptido multimérico modulador de linfocitos T que comprende un polipéptido IL-2 como dominio modulador ("MOD") también se denomina "IL-2/synTac", "un polipéptido IL-2/synTac" o un "polipéptido IL-2/multimérico."

15 En algunos casos, un polipéptido multimérico como se describió generalmente en la presente descripción comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el primer polipéptido comprende, en orden del extremo amino terminal (N-terminal) al extremo carboxilo terminal (C-terminal): a) un epítopo (por ejemplo, un epítopo de linfocitos T); b) un primer polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y c) un polipéptido inmunomodulador (por ejemplo, un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción); y donde el segundo polipéptido comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: a) un segundo polipéptido de MHC; y b) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig). En otros casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el primer polipéptido comprende, en orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: a) un epítopo (por ejemplo, un epítopo de linfocitos T); y b) un primer polipéptido de MHC; y donde el segundo polipéptido comprende, en orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: a) un polipéptido inmunomodulador (por ejemplo, un polipéptido IL2 variante de la presente descripción); b) un segundo polipéptido de MHC; y c) un polipéptido Fc de Ig. En algunos casos, el primer y el segundo polipéptidos de MHC son polipéptidos de MHC clase I; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido de MHC es un polipéptido de β2 microglobulina de clase I (B2M o β2M), y el segundo polipéptido de MHC es una cadena pesada (cadena H) de MHC clase I; o el primer polipéptido de MHC es una cadena H de MHC clase I y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido β2M de MHC clase I). En otros casos, el primer y el segundo polipéptidos de MHC son polipéptidos de MHC clase II; por ejemplo, en algunos casos, el primer polipéptido de MHC es un polipéptido de MHC clase II de cadena α, y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido de MHC clase II de cadena β. En otros casos, el primer polipéptido es un polipéptido de MHC clase II de cadena β, y el segundo polipéptido de MHC es un polipéptido de MHC clase II de cadena α. En algunos casos, el polipéptido multimérico incluye dos o más polipéptidos inmunomoduladores, donde al menos uno de los polipéptidos inmunomoduladores es un polipéptido inmunomodulador de IL2 variante de la presente descripción. Cuando un polipéptido multimérico de la presente descripción incluye dos o más polipéptidos inmunomoduladores, en algunos casos, los dos o más polipéptidos inmunomoduladores están presentes en la misma cadena polipeptídica, y pueden estar en tandem. Cuando un polipéptido multimérico de la presente descripción incluye dos o más polipéptidos inmunomoduladores, en algunos casos, los dos o más polipéptidos inmunomoduladores están presentes en polipéptidos separados. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción es un heterodímero. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción es un polipéptido trimérico.

45 En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC; ii) un polipéptido de Fc de Ig; y iii) un dominio inmunomodulador (por ejemplo, un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción). En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC; ii) un dominio inmunomodulador (por ejemplo, un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción). En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio inmunomodulador (por ejemplo, un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción) y ii) un segundo polipéptido de MHC. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un primer polipéptido de MHC y iii) un dominio inmunomodulador (por ejemplo, un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción); y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un segundo polipéptido de MHC. En algunos casos, donde un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende una estructura que no es Ig, la estructura que no es Ig es un péptido XTEN, un polipéptido transferrina, un polipéptido receptor de Fc, un polipéptido similar a la elastina, un polipéptido similar a la seda o un polipéptido similar a la seda-elastina.

60 En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción es monovalente. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción es multivalente. En algunos casos, un polipéptido multimérico multivalente de la presente descripción comprende un polipéptido Fc de inmunoglobulina en uno del primer o

segundo polipéptido. Por ejemplo, en dependencia del polipéptido Fc presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción, el polipéptido multimérico puede ser un homodímero, donde dos moléculas del polipéptido multimérico están presentes en el homodímero, donde las dos moléculas del polipéptido multimérico pueden unirse entre sí por disulfuro, por ejemplo, a través del polipéptido Fc presente en las dos moléculas. Como otro ejemplo, un polipéptido multimérico de la presente descripción puede comprender tres, cuatro o cinco moléculas del polipéptido multimérico, donde las moléculas del polipéptido multimérico pueden unirse entre sí por disulfuro, por ejemplo, a través del polipéptido Fc presente en las moléculas.

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un polipéptido de β2M y iii) un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) una cadena pesada de MHC clase I; y ii) un polipéptido de Fc. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un polipéptido de β2M y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un polipéptido de IL2 variante de la presente descripción; ii) una cadena pesada de MHC clase I; iii) un polipéptido de Fc. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; ii) un polipéptido β2M; iii) un primer polipéptido de IL2 variante de la presente descripción; iv) un segundo polipéptido de IL2 variante de la presente descripción; y v) una tercera variante de polipéptido IL2 de la presente descripción; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) una cadena pesada de MHC clase I; y ii) un polipéptido de Fc. En algunos casos, el primer, segundo y tercer polipéptidos de IL2 variantes tienen la misma secuencia de aminoácidos. En algunos casos, el primer, segundo y tercer polipéptidos de IL2 variantes difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un polipéptido β2M; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un primer polipéptido de IL2 variante de la presente descripción; ii) un segundo polipéptido de IL2 variante de la presente descripción; iii) un tercer polipéptido de IL2 variante de la presente descripción; iv) una cadena pesada de MHC clase I; y v) un polipéptido de Fc. En algunos casos, el primer, segundo y tercer polipéptidos de IL2 variantes tienen la misma secuencia de aminoácidos. En algunos casos, el primer, segundo y tercer polipéptidos de IL2 variantes difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos.

Sustituciones F42 y H16

En algunos casos, un polipéptido de IL-2 variante de simple copia está presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende dos copias del polipéptido de IL-2 variante, por ejemplo, donde las dos copias se encuentran en tandem sin enlazador entre las dos copias, o están en tandem y separadas por el péptido enlazador. En algunos casos, el polipéptido multimérico de la presente descripción comprende tres copias del polipéptido de IL-2 variante, por ejemplo, donde las tres copias se encuentran en tandem sin enlazadores entre las tres copias, o están en tandem y separadas por un péptido enlazador. En algunos casos, cuando una IL-2/synTac de la presente descripción comprende la cadena pesada de HLA clase I y β2M, el/los polipéptido(s) IL-2 está/están en la cadena polipeptídica que comprende la cadena pesada de HLA clase I. En algunos casos, donde una IL-2/synTac de la presente descripción comprende la cadena pesada de HLA clase I y β2M, el/los polipéptido(s) IL-2 está/están en la cadena polipeptídica que comprende el polipéptido β2M. En algunos casos, un polipéptido multimérico de la presente descripción comprende 2 copias de IL-2 variante que comprende las sustituciones F42A y H16A, donde el polipéptido multimérico comprende polipéptidos de cadena pesada de HLA clase I y β2M, y donde las 2 copias de IL-2 (F42A, H16A) están en la cadena polipeptídica que comprende la cadena pesada de HLA clase I. En algunos casos, el polipéptido de IL-2 variante o un synTac que comprende el mismo, tiene una afinidad de unión a IL-2R que es de aproximadamente 100 nM a 150 nM, de aproximadamente 150 nM a aproximadamente 200 nM, de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 250 nM, de aproximadamente 250 nM a aproximadamente 300 nM, de aproximadamente 300 nM a aproximadamente 350 nM, de aproximadamente 350 nM a aproximadamente 400 nM, de aproximadamente 400 nM a aproximadamente 500 nM, de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 600 nM, de aproximadamente 600 nM a aproximadamente 700 nM, de aproximadamente 700 nM a aproximadamente 800 nM, de aproximadamente 800 nM a aproximadamente 900 nM, de aproximadamente 900 nM a aproximadamente 1 μM, de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 5 μM, de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM, de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 15 μM, de aproximadamente 15 μM a aproximadamente 20 μM, de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 25 μM, de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 μM, de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 75 μM o de aproximadamente 75 μM a aproximadamente 100 μM. En algunos casos, el polipéptido de IL-2 variante presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción tiene una longitud de 133 aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido de IL-2 variante comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B (que comprende las sustituciones de H16A y F42A).

Múltiples dominios inmunomoduladores

Como se indicó anteriormente, en algunos casos, un polipéptido multimérico comprende dos o más polipéptidos inmunomoduladores. En algunos casos, al menos uno de dos o más polipéptidos inmunomoduladores es un polipéptido inmunomodulador variante. Por ejemplo, en el caso de una IL-2/synTac, en algunos casos, al menos uno de dos o más polipéptidos inmunomoduladores es un polipéptido de IL-2 variante.

5 En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende dos o más copias de un polipéptido de IL-2 variante de la presente descripción. En algunos casos, los dos o más polipéptidos de IL-2 variantes están en la misma cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico. En algunos casos, los dos o más polipéptidos de IL-2 variantes están en cadenas polipeptídicas separadas de un polipéptido multimérico.

10 En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende un primer polipéptido inmunomodulador, y al menos un segundo polipéptido inmunomodulador, donde el primer polipéptido inmunomodulador es un polipéptido de IL-2 variante de la presente descripción, y el segundo polipéptido inmunomodulador no es un polipéptido de IL-2. Por ejemplo, en algunos casos, el segundo polipéptido inmunomodulador es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF); por ejemplo, un polipéptido FasL, un polipéptido 4-1BBL, un polipéptido CD40, un polipéptido OX40L, un polipéptido CD30L, un polipéptido CD70, etc. En algunos casos, el segundo polipéptido inmunomodulador de un polipéptido multimérico es un polipéptido coestimulador de linfocitos T y es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig); por ejemplo, un polipéptido CD7, un polipéptido CD86, un polipéptido ICAM, etc. En algunos casos, el segundo polipéptido inmunomodulador es 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, PD-L1, CD86, FasL y PD-L2. Los polipéptidos inmunomoduladores adecuados de un polipéptido multimérico de la presente descripción incluyen, por ejemplo, CD7, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotoxinas beta, 3/TR6, ILT3, ILT4 o HVEM.

25 Otros dominios moduladores de linfocitos T (MOD) que pueden incluirse en un polipéptido multimérico de la presente descripción incluyen productos génicos humanos (proteína) de origen natural o sintéticos, reactivos de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fv de simple cadena, aptámeros, nanocuerpo) dirigido a un producto genético humano, que incluye, de modo no limitante, a todas las proteínas secretadas que surgen de mecanismos de secreción clásicos y no clásicos (por ejemplo, FGF2, IL1, S100A4), y ectodomios de todas las proteínas de la superficie celular ancladas por segmentos de proteínas codificadas genéticamente de origen natural (amplitudes de membrana única o múltiple) o modificaciones postraduccionales tales como enlaces GPI). Cualquier reactivo de afinidad de origen natural o sintético (por ejemplo, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fv de simple cadena, aptámero, nanocuerpo, lectina, etc.) dirigido a un glicano de la superficie celular u otra modificación postraduccional (por ejemplo, sulfatación). Los ejemplos incluyen, de modo no limitante, miembros de la familia TNF/TNFR (OX40L, ICOSL, FASL, LTA, TRAIL LTB, CD153, TNFSF9, RANKL, TWEAK, TNFSF13, TNFSF13b, TNFSF14, TNFSF15, TNFSF18, CD40LG, CD70) o reactivos de afinidad dirigidos a los miembros de la familia TNF/TNFR; miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (VISTA, PD1, PD-L1, PD-L2, B71, B72, CTLA4, CD28, TIM3, CD4, CD8, CD19, cadenas receptoras de linfocitos T, ICOS, Ligando ICOS, HHLA2, butirofilinas, BTLA, B7-H3, B7-H4, CD3, CD79a, CD79b, CAMS de IgSF (que incluye CD2, CD58, CD48, CD150, CD229, CD244, ICAM-1), receptores similares a inmunoglobulinas leucocitarias (LILR), receptores similares a inmunoglobulinas de células asesinas (KIR)), miembros de la superfamilia de lectina, selectinas, citocinas/quimiocina y receptores de citocinas/quimiocinas, factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento), moléculas de adhesión (integrinas, fibronectinas, cadherinas), o ectodomios de proteína integral de múltiples segmentos transmembrana, o reactivos de afinidad dirigidos a la superfamilia de inmunoglobulinas y productos génicos enumerados. Además, los homólogos/ortólogos activos de estos productos génicos, que incluyen, de modo no limitante, secuencias virales (por ejemplo, CMV, EBV), secuencias bacterianas, secuencias fúngicas, patógenos eucariotas (por ejemplo, *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Babesia*, *Eimeria*, *Teileria*, *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Leishmania* y *Trypanosoma*), y regiones codificantes derivadas de mamíferos. Además, un MOD puede comprender un fármaco de molécula pequeña dirigido a un producto genético humano.

50 Polipéptidos adicionales

Una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico puede incluir uno o más polipéptidos además de los descritos anteriormente. Los polipéptidos adicionales adecuados incluyen marcadores de epítopos y dominios de afinidad. El uno o más polipéptidos adicionales se pueden incluir en el extremo N-terminal de una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico, en el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico, o internamente dentro de una cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico.

Etiqueta de epítopos

60 Las etiquetas de epítopos adecuadas incluyen, de modo no limitante, hemaglutinina (HA; por ejemplo, YPYDVPDYA (SEQ ID NO:79); FLAG (por ejemplo, DYKDDDDK (SEQ ID NO:80); c-myc (por ejemplo, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:81) y similares.

Dominio de afinidad

65

Los dominios de afinidad incluyen secuencias de péptidos que pueden interactuar con un compañero de unión, por ejemplo, tal como uno inmovilizado en un soporte sólido, útil para la identificación o purificación. Las secuencias de ADN que codifican múltiples aminoácidos individuales consecutivos, tal como histidina, cuando se fusionan a la proteína expresada, pueden usarse para la purificación en una etapa de la proteína recombinante mediante unión de alta afinidad a una columna de resina, tal como sefarosa y níquel. Los dominios de afinidad ilustrativos incluyen His5 (HHHHH) (SEQ ID NO:82), HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO:83), C-myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:81), Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:80), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:84), hemaglutinina, por ejemplo, etiqueta de HA (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO:79), glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina, dominio de unión a celulosa, RYIRS (SEQ ID NO:85), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:86), dominio de unión a quitina, péptido S, péptido T7, dominio SH2, etiqueta de ARN de extremo C, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:87), dominios de unión a metales, por ejemplo, dominios de unión a zinc o dominios de unión a calcio tales como los de las proteínas de unión a calcio, por ejemplo, calmodulina, troponina C, calcineurina B, cadena ligera de miosina, recoverina, S-modulina, visinina, VILIP, neurocalcina, hipocalcina, freqüenina, caltractina, subunidad grande de calpaina, proteínas S100, parvalbúmina, calbindina D9K, calbindina D28K y calretinina, interinas, biotina, estreptavidina, MyoD, secuencias de cremalleras de leucina y proteína de unión a maltosa.

Ejemplos de polipéptidos IL-2/multiméricos

Los siguientes son ejemplos de un polipéptido multimérico IL-2/synTac.

En algunos casos, un polipéptido multimérico IL-2/synTac comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un polipéptido β2-microglobulina (β2M) que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34A; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal: i) un polipéptido de IL-2 variante de la presente descripción; ii) un polipéptido de cadena pesada del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C; y iii) un polipéptido Fc de IgG1 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de N297A, L234A, L235A, L234F, L235E y P331S. En algunos casos, el polipéptido de IL-2 variante comprende una sustitución H16A y F42A. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución N297A. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución L234A y una sustitución L235A. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución L234F y una sustitución L235E. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución L234F, una sustitución L235E y una sustitución P331S. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende dos copias del polipéptido de IL-2 variante. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un enlazador peptídico entre el epítopo y el polipéptido de β2M. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende un enlazador peptídico entre uno o más de: a) una primera copia del polipéptido de IL-2 variante y una segunda copia del polipéptido de IL-2 variante, b) el polipéptido de IL-2 variante y el polipéptido de cadena pesada de MHC y c) entre el polipéptido de cadena pesada de MHC y el polipéptido de Fc de IgG1. En algunos casos, el enlazador peptídico se selecciona de (GGGGS)₃ (SEQ ID NO:207), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO:208) y AAAGG (SEQ ID NO:73). En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33B. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33C. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33D.

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo; y ii) un polipéptido β2-microglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34A; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un polipéptido IL-2 variante que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B; ii) un polipéptido de cadena pesada del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C; y iii) un polipéptido de Fc de IgG1 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de N297A, L234A, L235A, L234F, L235E y P331S. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución N297A. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución L234A y una sustitución L235A. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución L234F y una sustitución L235E. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende una sustitución L234F, una sustitución L235E y una sustitución P331S. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33B. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33C. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33D. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende dos copias del polipéptido de IL-2 variante. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un enlazador peptídico entre el epítopo y el polipéptido de β2M. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende un enlazador peptídico entre uno o más de: a) una primera copia del polipéptido de IL-2 variante y una segunda copia del polipéptido de IL-2 variante, b) el polipéptido de IL-2 variante y el polipéptido de cadena pesada de MHC y c) entre el polipéptido de cadena pesada de MHC y el polipéptido de Fc de IgG1. En algunos casos, el enlazador peptídico se selecciona de (GGGGS)₃ (SEQ ID NO:207), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO:208) y AAAGG (SEQ ID NO:73).

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPETT (SEQ ID NO:77); y ii) un polipéptido β 2-microglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34A; y b) un segundo polipéptido que comprende, en orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

5 i) un polipéptido de IL-2 variante que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B; ii) un polipéptido de cadena pesada del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C; y iii) un polipéptido de Fc de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A, 33B, 33C o 33D. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33B. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33C. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33D. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende dos copias del polipéptido de IL-2 variante. En algunos casos, el primer polipéptido comprende un enlazador peptídico entre el epítopo y el polipéptido de β 2M. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende un enlazador peptídico entre uno o más de: a) una primera copia del polipéptido de IL-2 variante y una segunda copia del polipéptido de IL-2 variante, b) el polipéptido de IL-2 variante y el polipéptido de cadena pesada de MHC y c) entre el polipéptido de cadena pesada de MHC y el polipéptido de Fc de IgG1. En algunos casos, el enlazador peptídico se selecciona de (GGGGS)₃ (SEQ ID NO:207), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO:208) y AAAGG (SEQ ID NO:73). En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33B. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33C. En algunos casos, el polipéptido de Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33D.

10 15 20

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 31; y b) un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 22.

En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 31; y b) un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 25.

30 En algunos casos, un polipéptido multimérico comprende: a) un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 31; y b) un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 28.

35 Formulaciones, dosis y vías de administración

Al llevar a cabo un método de tratamiento, puede formularse un synTac en una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, y puede formularse un inhibidor de punto de control inmunitario en una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por simplicidad, el término "agente activo" se usa más abajo para referirse a un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario. En general, el synTac y el inhibidor de punto de control inmunitario están presentes en composiciones separadas.

45 La composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, de los cuales se conoce una variedad en la técnica y no es necesario discutirlos de forma detallada en la presente descripción. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en varias publicaciones que incluyen, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19^{na} ed. (1995), o ediciones posteriores, Mack Publishing Co; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20^{ra} edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel y otros, eds 7^{ma} ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe y otros, eds., 3^{ra} ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

50 Una composición farmacéutica puede comprender un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una composición farmacéutica será adecuada para administración a un sujeto, por ejemplo, será estéril. Por ejemplo, en algunos casos, una composición farmacéutica será adecuada para la administración a un sujeto humano, por ejemplo, cuando la composición es estéril y está libre de pirógenos y/u otras toxinas.

60 Las composiciones pueden comprender otros componentes, tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato y similares de grados farmacéuticos. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de amortiguación y de ajuste de pH, agentes para ajustar la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, clorhidrato, sales de sulfato, solvatos (por ejemplo, sales iónicas mixtas, agua, componentes orgánicos), hidratos (por ejemplo, agua) y similares.

Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una solución acuosa, forma en polvo, gránulos, comprimidos, pastillas, supositorios, cápsulas, suspensiones, aerosoles y similares. La composición se puede formular de acuerdo con las diversas vías de administración que se describen más abajo.

- 5 Donde se administra un agente activo (un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario) como un inyectable (por ejemplo, de forma subcutánea, intraperitoneal, intramuscular y/o intravenosa) directamente en un tejido, se puede proporcionar una formulación como una forma de dosificación lista para su uso, o como forma no acuosa (por ejemplo, un polvo para reconstituir que se mantiene estable en almacenamiento) o forma acuosa, tal como un líquido compuesto de excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones también se pueden proporcionar para mejorar la semivida en suero de un agente activo después de la administración. Por ejemplo, la proteína se puede proporcionar en una formulación de liposomas preparada con un coloide u otras técnicas convencionales para extender la semivida del suero. Se encuentran disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas, tal como se describió en, por ejemplo, Szoka y otros, 1980 *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467, patentes de Estados Unidos núms. 4,235,871, 4,501,728 y 4,837,028. Las preparaciones también se pueden proporcionar en formas de liberación controlada o de liberación lenta.

- 10 Otros ejemplos de formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas, antioxidantes, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes.
- 20 Por ejemplo, una composición farmacéutica de la presente se puede encontrar en un contenedor, por ejemplo, un contenedor estéril, tal como una jeringa. Las formulaciones se pueden presentar en contenedores sellados con dosis unitarias o dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en condiciones de criodesecación (liofilización) que solo requieren la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, inmediatamente antes de usar en inyección. Es posible preparar suspensiones y soluciones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

- 25 La concentración de un agente activo (un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario) en una formulación puede variar ampliamente (por ejemplo, de menos de alrededor de 0,1 %, generalmente en o al menos alrededor de 2 % hasta 20 % a 50 % o más en peso) y usualmente se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades y factores con base en el paciente de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente.

- 30 La presente descripción proporciona un contenedor que comprende un agente activo (un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario), por ejemplo, un recipiente que comprende una composición líquida que comprende un agente activo. Por ejemplo, el contenedor puede ser una jeringa, una ampolla y similares. En algunos casos, el contenedor estéril. En algunos casos, tanto el contenedor como la composición son estériles.

- 35 La presente descripción proporciona composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden un agente activo (un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario). Una composición puede comprender: a) un agente activo (un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario); y b) un excipiente, como se describió anteriormente. En algunos casos, el excipiente es un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Composiciones que comprenden un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante

- 40 En algunos casos, un synTac se administra como un polipéptido multimérico per se. En otros casos, se administran uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un synTac, en lugar de administrar un synTac como un polipéptido multimérico per se. El/los ácido(s) nucleicos pueden estar presentes en una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica puede comprender uno o más vectores de expresión recombinantes que comprenden el uno o más ácidos nucleicos. Se conoce una amplia variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables en la técnica y no es necesario analizarlos en detalle en la presente descripción. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en varias publicaciones que incluyen, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20^{da} edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel y otros, eds 7^{ma} ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe y otros, eds., 3^{ra} ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

- 45 Una formulación farmacéutica puede incluir un ácido nucleico o vector de expresión recombinante de la presente descripción en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 90 % (p/p). En la descripción de formulaciones que se encuentra más abajo, se entenderá que "vector de expresión recombinante o ácido nucleico" incluye un ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende secuencias de nucleótidos que codifican un synTac.

- 50 Un ácido nucleico o vector de expresión recombinante se puede mezclar, encapsular, conjugar o asociar de cualquier otra manera con otros compuestos o mezclas de compuestos; dichos compuestos pueden incluir, por ejemplo, liposomas o moléculas seleccionadas como diana por receptores. Un ácido nucleico o vector de expresión

recombinante se puede combinar en una formulación con uno o más componentes que favorecen la incorporación, distribución y/o absorción.

5 Es posible formular una composición de ácido nucleico o vector de expresión recombinante en cualquiera de muchas formas de dosificación posible, tales como, de modo no limitante, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Una composición de ácido nucleico o vector de expresión recombinante también se puede formular como suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener 10 estabilizantes.

Una formulación que comprende un ácido nucleico o vector de expresión recombinante puede ser una formulación liposomal. Tal como se usa en la presente, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares 15 que tienen una membrana formada a partir de un material lipofílico y un interior acuoso que contiene la composición a suministrar. Los liposomas catiónicos son liposomas con carga positiva que pueden interactuar con moléculas de ADN de carga negativa para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o que tienen carga negativa atrapan ADN en lugar de formar complejos con este. Pueden usarse tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para suministrar un ácido nucleico o vector de expresión recombinante.

20 Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", una expresión que, tal como se usa en la presente, hace referencia a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, generan mejor duración en la circulación con relación a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados de forma estérica son aquellos en los cuales parte de la 25 porción lipídica que forma vesículas del liposoma comprenden uno o más glicolípidos o se deriva de uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Adicionalmente, se describen los liposomas y sus usos en la patente de Estados Unidos núm 6,287,860.

30 Las formulaciones y composiciones de la presente descripción también pueden incluir surfactantes. Se conoce en la técnica el uso de surfactantes en productos farmacológicos, formulaciones y emulsiones. Adicionalmente, se describen los surfactantes y sus usos en la patente de Estados Unidos núm. 6,287,860.

En una modalidad, se incluyen varios potenciadores de penetración para afectar el suministro eficiente de ácidos 35 nucleicos. Además de favorecer la difusión de fármacos no lipofílicos a través de membranas celulares, los potenciadores de penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipofílicos. Los potenciadores de penetración se pueden clasificar como parte de una de cinco categorías, es decir, surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no surfactantes no quelantes. Adicionalmente, se describen los potenciadores de penetración y sus usos en la patente de Estados Unidos núm 6,287,860.

40 Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sachets, comprimidos o minicomprimidos. Los espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsificantes, asistentes de dispersión o aglutinantes pueden ser convenientes. Las formulaciones orales adecuadas incluyen aquellas en las cuales se administra un ácido nucleico antisentido junto con uno o más potenciadores de la penetración, 45 surfactantes y quelantes. Los surfactantes adecuados incluyen, de modo no limitante, ácidos grasos y/o ésteres o sales de estos, ácidos biliares y/o sales de estos. Se describen sales/ácidos biliares y ácidos grasos adecuados y sus usos de forma adicional en la patente de Estados Unidos núm. 6,287,860. También son adecuadas combinaciones de potenciadores de penetración, por ejemplo, sales/ácidos grasos en combinación con sales/ácidos biliares. Una combinación adecuada ilustrativa es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. 50 Potenciadores de penetración adicionales incluyen, de modo no limitante, éter de polioxetileno-9-laurilo y éter de polioxetileno-20-cetilo. Los potenciadores de penetración adecuados también incluyen propilenglicol, dimetilsulfóxido, trietanolamina, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, 2-pirrolidona y derivados de estos, alcohol tetrahidrofuránico y AZONE™.

55 Métodos de tratamiento

La presente descripción proporciona un polipéptido multimérico para su uso en un método de tratamiento, que 60 comprende administrar un inhibidor de punto de control inmunitario y un synTac. En algunos casos, el método comprende administrar a un individuo que lo necesita: a) una primera composición que comprende un synTac; y b) una segunda composición que comprende un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, un método de tratamiento de la presente descripción comprende administrar a un individuo que lo necesita: a) una primera composición que comprende uno o más vectores de expresión recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un synTac; y b) una segunda composición que comprende un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, un método de tratamiento de la presente descripción comprende administrar a 65 un individuo que lo necesita: a) una primera composición que comprende una o más moléculas de ARNm que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico; y b) una segunda composición que

comprende un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo específico para un polipéptido del punto de control inmunitario.

Por lo tanto, por ejemplo, un método de tratamiento puede comprender la coadministración de un synTac (por ejemplo, un synTac de 4-1BBL, synTac de IL-2, etc., como se describió anteriormente) y un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. Por "coadministración" se entiende que tanto un synTac (por ejemplo, un synTac de 4-1BBL, synTac de IL-2, etc., como se describió anteriormente) como un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario se administran a un individuo, aunque no necesariamente al mismo tiempo, para lograr un efecto terapéutico que es el resultado de haber administrado tanto el synTac como el inhibidor de punto de control inmunitario. La administración de synTac (por ejemplo, un synTac de 4-1BBL, synTac de IL-2, etc.) y el anticuerpo específico para un punto de control inmunitario puede ser sustancialmente simultáneo, por ejemplo, la synTac (por ejemplo, un synTac de 4-1BBL, synTac de IL-2, etc.) puede administrarse a un individuo dentro de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, en aproximadamente 1 minuto, en aproximadamente 5 minutos, en aproximadamente 15 minutos, en aproximadamente 30 minutos, en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente 4 horas, en aproximadamente 8 horas, en aproximadamente 12 horas, o en aproximadamente 24 horas) después de la administración del anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. En algunos casos, se administra un synTac (por ejemplo, un synTac de 4-1BBL, synTac de IL-2, etc.) a un individuo que está en tratamiento con un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. La administración de synTac (por ejemplo, un synTac de 4-1BBL, synTac de IL-2, etc.) y el anticuerpo específico para un punto de control inmunitario puede ocurrir en diferentes momentos y/o a diferentes frecuencias.

Como ejemplo, un método de tratamiento puede comprender la coadministración de un synTac (por ejemplo, un synTac de IL-2, como se describió anteriormente) y un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. Por "coadministración" se entiende que tanto un synTac de IL-2 como un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario se administran a un individuo, aunque no necesariamente al mismo tiempo, para lograr un efecto terapéutico que es el resultado de haber administrado tanto el synTac como el inhibidor de punto de control inmunitario. La administración de synTac de IL-2 y el anticuerpo específico para un punto de control inmunitario puede ser sustancialmente simultánea, por ejemplo, la synTac de IL-2 puede administrarse a un individuo dentro de alrededor de 1 minuto a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, en alrededor de 1 minuto, en alrededor de 5 minutos, en alrededor de 15 minutos, en alrededor de 30 minutos, en alrededor de 1 hora, en alrededor de 4 horas, en alrededor de 8 horas, en alrededor de 12 horas, o en alrededor de 24 horas) después de la administración del anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. En algunos casos, se administra un synTac de IL-2 a una persona que está en tratamiento con un anticuerpo específico para un punto de control inmunitario. La administración de synTac de IL-2 y el anticuerpo específico para un punto de control inmunitario puede ocurrir en diferentes momentos y/o a diferentes frecuencias.

Un método de tratamiento puede modular una actividad de un linfocito T diana. En algunos casos, por ejemplo, cuando el linfocito T diana es un linfocito T CD8⁺, el polipéptido multimérico comprende polipéptidos de MHC clase I (por ejemplo, cadena pesada de MHC clase I y β2-microglobulina). En algunos casos, por ejemplo, cuando el linfocito T diana es un linfocito T CD4⁺, el polipéptido multimérico comprende polipéptidos de MHC clase II (por ejemplo, cadena α de MHC clase II; cadena β de MHC clase II).

Cuando un polipéptido multimérico incluye un polipéptido inmunomodulador que es un polipéptido activador, se activa el linfocito T específico para el epítopo. En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T que es específico de un epítopo presente en una célula cancerosa, y el contacto del linfocito T específico para el epítopo con el polipéptido multimérico aumenta la actividad citotóxica del linfocito T hacia la célula cancerosa. En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T que es específico para un epítopo presente en una célula cancerosa, y un método de la presente descripción aumenta el número de linfocitos T específicos del epítopo.

En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T que es específico para un epítopo presente en una célula infectada por virus y un método de la presente descripción aumenta la actividad citotóxica del linfocito T respecto a la célula infectada por virus. En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T que es específico para un epítopo presente en una célula infectada por virus y un método de la presente descripción aumenta la cantidad de linfocitos T específicos para el epítopo.

Cuando un polipéptido multimérico incluye un polipéptido inmunomodulador que es un polipéptido de inhibición, un método de la presente descripción inhibe el linfocito T específico para el epítopo. En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T autorreactivo que es específico de un epítopo presente en un antígeno propio, y un método de la presente descripción reduce el número de linfocitos T autorreactivos.

En algunos casos, el polipéptido inmunomodulador es un polipéptido activador y el polipéptido multimérico activa el linfocito T específico para el epítopo. En algunos casos, el epítopo es un epítopo asociado con cáncer y el polipéptido multimérico aumenta la actividad de un linfocito T específico para el epítopo asociado con cáncer.

En algunos casos, un método de tratamiento trata un cáncer en una persona que tiene el cáncer. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un polipéptido multimérico para el uso en un método para tratar el cáncer en un individuo, el método comprende administrar al individuo: a) un polipéptido multimérico de la presente descripción, o uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores de expresión; ARNm; etc.) que comprende secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido multimérico, donde el polipéptido multimérico comprende un epítopo de linfocitos T que es un epítopo del cáncer, y donde el polipéptido multimérico comprende un polipéptido inmunomodulador estimulador; y b) un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, "cantidades efectivas" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunológico son cantidades que, cuando se administran en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la cantidad de células cancerosas en el individuo. Por ejemplo, en algunos casos, "cantidades efectivas" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario son cantidades que, cuando se administran en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce el número de células cancerosas en el individuo en al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % en comparación con el número de células cancerosas en el individuo antes de la administración del polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario, o en ausencia de administración con el polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, "cantidades efectivas" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario son cantidades que, cuando se administran en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la cantidad de células cancerosas en el individuo hasta niveles no detectables. En algunos casos, "cantidades efectivas" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario son cantidades que, cuando se administran en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la masa tumoral en el individuo. Por ejemplo, en algunos casos, "cantidades efectivas" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario son cantidades que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, reduce la masa tumoral en el individuo en al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %, en comparación con la masa tumoral en el individuo antes de la administración del polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario o en ausencia de administración del polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, "cantidades efectivas" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario son cantidades que, cuando se administran en una o más dosis a un individuo que lo necesita, aumentan el tiempo de supervivencia del individuo. Por ejemplo, en algunos casos, una "cantidad efectiva" de un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario son cantidades que, cuando se administra en una o más dosis a un individuo que lo necesita, aumenta el tiempo de supervivencia del individuo en al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, de 3 meses a 6 meses, de 6 meses a 1 año, de 1 año a 2 años, de 2 años a 5 años, de 5 años a 10 años, o más de 10 años, en comparación con el tiempo de supervivencia esperado del individuo en ausencia de administración con el polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario.

En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T que es específico para un epítopo presente en una célula infectada por virus y un método de la presente descripción aumenta la actividad citotóxica del linfocito T respecto a la célula infectada por virus. En algunos casos, el linfocito T específico para el epítopo es un linfocito T que es específico para un epítopo presente en una célula infectada por virus y un método de la presente descripción aumenta la cantidad de linfocitos T específicos para el epítopo.

Como se indicó anteriormente, en algunos casos, al poner en práctica un método de tratamiento en un sujeto, se administra un polipéptido multimérico a un individuo que lo necesita como el polipéptido en sí mismo. En otros casos, al poner en práctica un método de tratamiento, se administran uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido multimérico a un individuo que lo necesita. Por lo tanto, en otros casos, uno o más ácidos nucleicos que codifican un synTac se administran a un individuo que lo necesita.

Dosificaciones – synTac

Una dosificación adecuada de un synTac se puede determinar por un médico tratante u otro personal médico calificado, en base a diversos factores clínicos. Tal como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, lo que incluye el tamaño, área superficial corporal y edad del paciente, el polipéptido o ácido nucleico particular a administrar, el sexo del paciente, el momento, la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. Un polipéptido multimérico (synTac) se puede administrar en cantidades entre 1 ng/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal por dosis, por ejemplo, entre 0,1 mg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 0,5 mg/kg de peso corporal y 5 mg/kg de peso corporal; sin embargo, se prevén dosis por encima o por debajo de este intervalo ilustrativo, especialmente al considerar los factores antemencionados. Si el régimen es una infusión continua, también puede encontrarse en el intervalo de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto. Un polipéptido multimérico se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal a

aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal.

- 5 En algunos casos, una dosis adecuada de un polipéptido multimérico es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente las velocidades de repetición para las dosis con base en los tiempos de residencia y las concentraciones del agente administrado en tejidos o fluidos corporales. Luego del tratamiento exitoso, puede ser conveniente que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la enfermedad, en donde un polipéptido multimérico se administra en dosis de mantenimiento que varían de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal.
- 10 15 Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de las dosis pueden variar en función del polipéptido multimérico específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Los expertos en la técnica pueden determinar las dosificaciones preferidas para un compuesto dado mediante una variedad de medios.
- 20 25 30 En algunas modalidades, se administran múltiples dosis de un polipéptido multimérico (o un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante que lo codifica). La frecuencia de administración de un polipéptido multimérico puede variar en dependencia de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, gravedad de los síntomas, etc. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido multimérico se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez a la semana (qw), dos veces a la semana (biw), tres veces a la semana (tiw), cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, cada dos días (qod), diariamente (qd), dos veces al día (qid) o tres veces al día (tid).

La duración de la administración de un polipéptido multimérico, por ejemplo, el período de tiempo durante el cual se administra un polipéptido multimérico, puede variar, en dependencia de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, la respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, un polipéptido multimérico puede administrarse durante un período de tiempo que varía de aproximadamente un día a aproximadamente una semana, de aproximadamente dos semanas a aproximadamente cuatro semanas, de aproximadamente un mes a aproximadamente dos meses, de aproximadamente dos meses a aproximadamente cuatro meses, de aproximadamente cuatro meses a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente ocho meses, de aproximadamente ocho meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 1 año a aproximadamente 2 años, o de aproximadamente 2 años a aproximadamente 4 años, o más.

- 40 Una dosificación adecuada de un synTac se puede determinar por un médico tratante u otro personal médico calificado, en base a diversos factores clínicos. Tal como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, lo que incluye el tamaño, área superficial corporal y edad del paciente, el polipéptido o ácido nucleico particular a administrar, el sexo del paciente, el momento, la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. Un polipéptido multimérico (synTac) se puede administrar en cantidades entre 1 ng/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal por dosis, por ejemplo, entre 0,1 mg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 0,5 mg/kg de peso corporal y 5 mg/kg de peso corporal; sin embargo, se prevén dosis por encima o por debajo de este intervalo ilustrativo, especialmente al considerar los factores antemencionados. Si el régimen es una infusión continua, también puede encontrarse en el intervalo de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto. Un polipéptido multimérico se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal.
- 45 50 55

- 60 En algunos casos, una dosis adecuada de un polipéptido multimérico es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente las velocidades de repetición para las dosis con base en los tiempos de residencia y las concentraciones del agente administrado en tejidos o fluidos corporales. Luego del tratamiento exitoso, puede ser conveniente que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la enfermedad, en donde un polipéptido multimérico se administra en dosis de mantenimiento que varían de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal,
- 65

de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal.

5 Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de las dosis pueden variar en función del polipéptido multimérico específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Los expertos en la técnica pueden determinar las dosificaciones preferidas para un compuesto dado mediante una variedad de medios.

10 En algunas modalidades, se administran múltiples dosis de un polipéptido multimérico (o un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante que lo codifica). La frecuencia de administración de un polipéptido multimérico puede variar en dependencia de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, gravedad de los síntomas, etc. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido multimérico se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez a la semana (qw), dos veces a la semana (biw), tres veces a la semana (tiw), cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, cada dos días (qod), diariamente (qd), dos veces al día (qid) o tres veces al día (tid).

15 20 25 La duración de la administración de un polipéptido multimérico, por ejemplo, el período de tiempo durante el cual se administra un polipéptido multimérico, puede variar, en dependencia de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, la respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, un polipéptido multimérico puede administrarse durante un período de tiempo que varía de aproximadamente un día a aproximadamente una semana, de aproximadamente dos semanas a aproximadamente cuatro semanas, de aproximadamente un mes a aproximadamente dos meses, de aproximadamente dos meses a aproximadamente cuatro meses, de aproximadamente cuatro meses a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente ocho meses, de aproximadamente ocho meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 1 año a aproximadamente 2 años, o de aproximadamente 2 años a aproximadamente 4 años, o más.

Dosificaciones – inhibidor de punto de control inmunitario

30 Una dosificación adecuada de un inhibidor de punto de control inmunitario se puede determinar por un médico tratante u otro personal médico calificado en base a diversos factores clínicos. Tal como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, lo que incluye el tamaño, área superficial corporal y edad del paciente, el polipéptido o ácido nucleico particular a administrar, el sexo del paciente, el momento, la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. Un inhibidor de punto de control inmunitario se puede administrar en cantidades entre 1 ng/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal por dosis, por ejemplo, entre 0,1 mg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 0,5 mg/kg de peso corporal y 5 mg/kg de peso corporal; sin embargo, se prevén dosis por encima o por debajo de dicho intervalo ilustrativo, especialmente al considerar los factores antemencionados. Si el régimen es una infusión continua, también puede encontrarse en el intervalo de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto. Un inhibidor de punto de control inmunitario se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 35 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal.

50 55 En algunos casos, una dosis adecuada de un inhibidor de punto de control inmunitario es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente las velocidades de repetición para las dosis con base en los tiempos de residencia y las concentraciones del agente administrado en tejidos o fluidos corporales. Luego del tratamiento exitoso, puede ser conveniente que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la enfermedad, en donde un inhibidor de punto de control inmunitario se administra en dosis de mantenimiento que varía de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, de 0,1 µg a 10 g por kg de peso corporal, de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal, de 10 µg a 100 mg por kg de peso corporal, de 100 µg a 10 mg por kg de peso corporal o de 100 µg a 1 mg por kg de peso corporal.

60 65 Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del inhibidor de punto de control inmunitario específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios. Los expertos en la técnica pueden determinar las dosificaciones preferidas para un compuesto dado mediante una variedad de medios.

65 En algunas modalidades, se administran múltiples dosis de un inhibidor de punto de control inmunitario. La frecuencia de administración de un inhibidor de punto de control inmunitario puede variar en dependencia de

cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, la gravedad de los síntomas, etc. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido multimérico se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez a la semana (qw), dos veces a la semana (biw), tres veces a la semana (tiw), cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, cada dos días (qod), diariamente (qd), dos veces al día (qid) o tres veces al día (tid).

La duración de la administración de un inhibidor de punto de control inmunitario, por ejemplo, el período de tiempo durante el cual se administra un inhibidor de punto de control inmunitario, puede variar, en dependencia de cualquiera de una variedad de factores, por ejemplo, la respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, un inhibidor de punto de control inmunitario puede administrarse durante un período de tiempo que varía de aproximadamente un día a aproximadamente una semana, de aproximadamente dos semanas a aproximadamente cuatro semanas, de aproximadamente un mes a aproximadamente dos meses, de aproximadamente dos meses a aproximadamente cuatro meses, de aproximadamente cuatro meses a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente ocho meses, de aproximadamente ocho meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 1 año a aproximadamente 2 años, o de aproximadamente 2 años a aproximadamente 4 años, o más.

Los siguientes son ejemplos no limitantes.

20 Pembrolizumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 2 mg/kg cada 3 semanas. Pembrolizumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 200 mg cada 3 semanas. En algunos casos, un método de la presente descripción proporciona una cantidad reducida de un anti-PD1 que necesita administrarse para lograr un beneficio clínico. Por ejemplo, en algunos casos, la cantidad de pembrolizumab que necesita administrarse para lograr un beneficio clínico puede reducirse de 10 % a 50 %, o más de 50 %, en comparación con la cantidad de pembrolizumab que necesita administrarse para lograr un beneficio clínico en ausencia de tratamiento con un synTac.

30 Nivolumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 3 mg/kg cada 2 semanas. Nivolumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 240 mg cada 2 semanas. En algunos casos, un método de la presente descripción proporciona una cantidad reducida de un anti-PD1 que necesita administrarse para lograr un beneficio clínico. Por ejemplo, en algunos casos, la cantidad de nivolumab que debe administrarse para lograr el beneficio clínico puede reducirse de 10 % a 50 %, o más de 50 %, en comparación con la cantidad de nivolumab que debe administrarse para lograr el beneficio clínico en ausencia de tratamiento con un synTac.

35 Atezolizumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 1200 mg cada 3 semanas. En algunos casos, un método de la presente descripción proporciona una cantidad reducida de un anti-PD1 que necesita administrarse para lograr un beneficio clínico. Por ejemplo, en algunos casos, la cantidad de atezolizumab que debe administrarse para lograr el beneficio clínico puede reducirse de 10 % a 50 %, o más de 50 %, en comparación con la cantidad de atezolizumab que debe administrarse para lograr el beneficio clínico en ausencia de tratamiento con un synTac.

45 El ipilimumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 3 mg/kg cada 3 semanas. El ipilimumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 10 mg/kg cada 3 semanas. El ipilimumab puede administrarse a una persona que lo necesite en una cantidad de 10 mg/kg cada 12 semanas. En algunos casos, un método de la presente descripción proporciona una cantidad reducida de un anti-PD1 que necesita administrarse para lograr un beneficio clínico. Por ejemplo, en algunos casos, la cantidad de ipilimumab que debe administrarse para lograr el beneficio clínico puede reducirse de 10 % a 50 %, o más de 50 %, en comparación con la cantidad de ipilimumab que debe administrarse para lograr el beneficio clínico en ausencia de tratamiento con un synTac.

Vías de administración

55 Un agente activo (un polipéptido multimérico; un inhibidor de punto de control inmunitario) se administra a un individuo mediante el uso de cualquier método y vía disponibles adecuados para el suministro de fármacos, que incluyen métodos *in vivo* y *ex vivo*, así como también vías de administración sistémicas y localizadas. En algunos casos, un synTac se administra mediante una primera vía de administración; y un inhibidor de punto de control inmunitario se administra mediante una segunda vía de administración que es diferente de la primera vía de administración. En algunos casos, un synTac y un inhibidor de punto de control inmunitario se administran por las mismas vías de administración.

60 Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen intratumoral, peritumoral, intramuscular, intratraqueal, intracraneal, subcutánea, intradérmica, aplicación tópica, intravenosa, intraarterial, rectal, nasal, oral, y otras vías de administración enterales y parenterales. Las vías de administración se pueden combinar, si se desea, o ajustarse en dependencia del polipéptido multimérico, el inhibidor de punto de control inmunitario y/o el efecto deseado.

- En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intravenosa; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intravenosa. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intramuscular; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intramuscular. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra localmente; y un inhibidor de punto de control inmunitario localmente. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intratumoral; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intratumoral. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra peritumoralmente; y un inhibidor de punto de control inmunitario peritumoralmente. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra intracranialmente; y un inhibidor de punto de control inmunitario intracranialmente. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía subcutánea; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía subcutánea.
- En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intravenosa; y un inhibidor de punto de control inmunitario peritumoralmente. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intramuscular; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intravenosa. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra sistémicamente; y un inhibidor de punto de control inmunitario localmente. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intratumoral; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intravenosa. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra sistémicamente; y un inhibidor de punto de control inmunitario peritumoralmente. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía intravenosa; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intracranial. En algunos casos, un polipéptido multimérico se administra por vía subcutánea; y un inhibidor de punto de control inmunitario por vía intravenosa.
- Un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario pueden administrarse a un huésped mediante el uso de cualquier método y vías convencionales disponibles adecuados para el suministro de fármacos convencionales, que incluyen rutas sistémicas o localizadas. En general, las vías de administración cuyo uso se contempla en un método de la presente descripción incluyen, de modo no limitante, vías entéricas, parenterales y de inhalación.
- Las vías de administración parenterales diferentes a la administración por inhalación incluyen, pero no se limitan necesariamente a, las vías tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, intratumoral, peritumoral e intravenosa, es decir, cualquier vía de administración que no sea a través del canal alimentario. La administración parenteral puede llevarse a cabo para efectuar el suministro sistémico o local de un agente activo (un synTac o un inhibidor de punto de control inmunitario). Cuando se deseé el suministro sistémico, la administración puede implicar el suministro por vía intravenosa.
- Sujetos adecuados para el tratamiento
- Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente descripción incluyen individuos que padecen de cáncer, lo que incluye individuos con diagnóstico de cáncer, individuos que recibieron tratamiento para cáncer, pero que no respondieron al tratamiento e individuos que recibieron tratamiento para cáncer y respondieron inicialmente, pero subsecuentemente se volvieron resistentes al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente descripción incluyen individuos con una infección (por ejemplo, una infección con un patógeno tal como una bacteria, un virus, un protozoario, etc.), lo que incluye individuos con diagnóstico de infección e individuos que recibieron tratamiento para una infección, pero que no respondieron al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente descripción incluyen individuos con una infección bacteriana, lo que incluye individuos con diagnóstico de infección bacteriana e individuos que recibieron tratamiento para una infección bacteriana, pero que no respondieron al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente descripción incluyen individuos con una infección viral, lo que incluye individuos con diagnóstico de infección viral e individuos que recibieron tratamiento para una infección viral, pero que no respondieron al tratamiento. Los sujetos adecuados para el tratamiento con un método de la presente descripción incluyen individuos con una enfermedad autoinmunitaria, lo que incluye individuos con diagnóstico de enfermedad autoinmunitaria e individuos que recibieron tratamiento para una enfermedad autoinmunitaria, pero que no respondieron al tratamiento.
- En algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con un inhibidor de punto de control inmunitario. En algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con un anticuerpo anti-PD1. Por ejemplo, en algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con pembrolizumab. Como otro ejemplo, en algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con nivolumab. En algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1. Por ejemplo, en algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con atezolizumab. En algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con un anticuerpo anti-CTLA4. Por ejemplo, en algunos casos, un método de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con ipilimumab. Como otro ejemplo, en algunos casos, un método

de la presente descripción comprende administrar un synTac a un individuo que se está sometiendo a tratamiento con tremelimumab.

En algunos casos, por ejemplo, en los que el epítopo es un epítopo de HPV, un sujeto adecuado para tratamiento con un método de la presente descripción es un individuo con diagnóstico de cáncer asociado con HPV o cáncer atribuible a HPV. Los cánceres asociados con HPV y cánceres atribuibles a HPV incluyen, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino y cáncer genitoanal.

Métodos para suministrar selectivamente un polipéptido coestimulador junto con un inhibidor de punto de control inmunitario a un individuo

La presente descripción, por lo tanto, proporciona un método para suministrar un polipéptido coestimulador tal como IL-2, o una variante de afinidad reducida de un polipéptido coestimulador de origen natural tal como una IL-2 variante descrita en la presente descripción, a un linfocito T seleccionado o una población de linfocitos T seleccionados, por ejemplo, de manera que un TCR específico para un epítopo dado se dirige, junto con la coadministración de un inhibidor de punto de control para proporcionar al paciente el efecto terapéutico tanto del suministro selectivo del polipéptido coestimulador como del inhibidor de punto de control. La presente descripción proporciona un método para suministrar un polipéptido coestimulador tal como IL-2, o una variante de afinidad reducida de un polipéptido coestimulador de origen natural tal como una IL-2 variante descrita en la presente descripción, selectivamente a un linfocito T diana que porta un TCR específico para el epítopo presente en un polipéptido multimérico de la presente descripción, junto con la coadministración de un inhibidor de punto de control para proporcionar al paciente el efecto terapéutico tanto del suministro selectivo del polipéptido coestimulador como del inhibidor de punto de control. El método comprende el contacto de una población de linfocitos T con un polipéptido multimérico de la presente descripción. La población de linfocitos T puede ser una población mezclada que comprende: i) el linfocito T diana; y ii) linfocitos T no diana que no son específicos para el epítopo (por ejemplo, linfocitos T que son específicos para un epítopo(s) que no es el epítopo al cual se une el linfocito T específico para el epítopo). El linfocito T específico para el epítopo es específico para el péptido que presenta el epítopo presente en el polipéptido multimérico, y se une al complejo HLA del péptido o complejo MHC del péptido proporcionado por el polipéptido multimérico. Poner en contacto la población de linfocitos T con el polipéptido multimérico suministra el polipéptido coestimulador (por ejemplo, IL-2 o una IL-2 variante de afinidad reducida) presente en el polipéptido multimérico selectivamente a los linfocitos T (s) que son específicos para el epítopo presente en el polipéptido multimérico. El inhibidor de punto de control se administra junto con el polipéptido multimérico (ya sea junto o en diferentes momentos antes y/o después de la administración del polipéptido multimérico) para proporcionar al paciente el efecto terapéutico tanto del suministro selectivo del polipéptido coestimulador como del inhibidor de punto de control.

Por lo tanto, la presente descripción describe un método para suministrar a un paciente (i) un inhibidor de punto de control como se describió anteriormente y (ii) un polipéptido coestimulador tal como IL-2, o una variante de afinidad reducida de un polipéptido coestimulador de origen natural tal como una IL-2 variante descrita en la presente descripción, o una combinación de ambos, selectivamente a un linfocito T diana, el método comprende poner en contacto una población mezclada de linfocitos T con un polipéptido multimérico de la presente descripción. La población mixta de linfocitos T comprende el linfocito T diana y linfocitos T no diana. El linfocito T diana es específico para el epítopo presente dentro del polipéptido multimérico. El contacto de la población mixta de linfocitos T con un polipéptido multimérico de la presente descripción, por lo tanto suministra el(los) polipéptido(s) coestimulador(es) presente(s) dentro del polipéptido multimérico al linfocito T diana. La coadministración del inhibidor de punto de control con el polipéptido multimérico (ya sea junto o en diferentes momentos antes y/o después de la administración del polipéptido multimérico) proporciona por lo tanto al paciente el efecto terapéutico tanto del suministro selectivo del polipéptido coestimulador como del inhibidor de punto de control.

Por ejemplo, se pone en contacto un polipéptido multimérico de la presente descripción con una población de linfocitos T que comprende: i) un(os) linfocito(s) diana específico(s) para el epítopo presente en el polipéptido multimérico y ii) un(os) linfocito(s) diana específico(s) no diana, por ejemplo, un(os) linfocito(s) diana específico(s) que sea(n) específico(s) para un(os) segundo(s) epítopo(s) que no es(son) el epítopo presente en el polipéptido multimérico. Poner en contacto la población da como resultado el suministro selectivo del(de los) polipéptido(s) coestimulador(es) (por ejemplo, polipéptido coestimulador de origen natural (por ejemplo, IL-2 de origen natural) o variante de afinidad reducida de un polipéptido coestimulador de origen natural (por ejemplo, una IL-2 variante descrita en la presente descripción)), que está presente en el polipéptido multimérico, al linfocito T diana. Por lo tanto, por ejemplo, menos de 50 %, menos de 40 %, menos de 30 %, menos de 25 %, menos de 20 %, menos de 15 %, menos de 10 %, menos de 5 % o menos de 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de los linfocitos T no diana se unen al polipéptido multimérico y, en consecuencia, el polipéptido coestimulador (por ejemplo, IL-2 o IL-2 variante) presente en los polipéptidos multiméricos no se suministra sustancialmente a los linfocitos T no diana. La coadministración del inhibidor de punto de control con el polipéptido multimérico (ya sea junto o en diferentes momentos antes y/o después de la administración del polipéptido multimérico) proporciona por lo tanto al paciente el efecto terapéutico tanto del suministro selectivo del polipéptido coestimulador como del inhibidor de punto de control.

En algunos casos, la población de linfocitos T se encuentra *in vitro*. En algunos casos, la población de linfocitos T se encuentra *in vitro* y se genera una respuesta biológica (por ejemplo, activación de linfocitos T y/o expansión y/o

diferenciación fenotípica) de la población de linfocitos T al polipéptido multimérico de la presente descripción en el contexto de un cultivo *in vitro*. Por ejemplo, se puede obtener una población mixta de linfocitos T de un individuo y se puede poner en contacto con el polipéptido multimérico *in vitro*. Dicho contacto puede comprender una exposición única o múltiples exposiciones de la población de los linfocitos T a dosis y/o en cronograma(s) de exposición definidos. En algunos casos, dicho contacto genera la unión/activación y/o expansión de linfocitos T diana de forma selectiva dentro de la población de linfocitos T y, como consecuencia, se genera una población de linfocitos T diana activados y/o expandidos. Por ejemplo, una población mixta de linfocitos T pueden ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Por ejemplo, se puede obtener PBMC de un paciente mediante técnicas de extracción de sangre y enriquecimiento de PBMC estándares antes de exponerlas a 0,1-1000 nM de un polipéptido multimérico de la presente descripción en condiciones estándares de cultivo de linfocitos. En momentos antes, durante y después de la exposición de la población de linfocitos T mixta con un cronograma y una dosis definidas, se puede monitorear la abundancia de linfocitos T diana en el cultivo *in vitro* mediante multímeros de MHC y péptido específicos y/o marcadores fenotípicos y/o actividad funcional (por ejemplo, ensayos ELISpot de citocina). En algunos casos, al lograr una abundancia y/o fenotipo óptimos de células específicas de antígeno *in vitro*, toda o una porción de la población de linfocitos T diana activadas y/o expandidas se administra al individuo (el individuo de quien se obtuvo la población mezclada de linfocitos T), que el individuo ya ha recibido la administración de un inhibidor de punto de control antes de la administración de los linfocitos T diana y/o recibirá la administración de un inhibidor de punto de control después de la administración de los linfocitos T diana.

En algunos casos, la población de linfocitos T se encuentra *in vitro*. Por ejemplo, una población mixta de linfocitos T se obtiene de un individuo y se pone en contacto con un polipéptido multimérico de la presente descripción *in vitro*. Dicho contacto, el cual puede comprender una o múltiples exposiciones de los linfocitos T a una(s) dosis y/o cronograma(s) de exposición definidos en el contexto de cultivo celular *in vitro*, puede usarse para determinar si la población mixta de linfocitos T incluye linfocitos T que son específicos para el epítopo presentado por el polipéptido multimérico. Se puede determinar la presencia de linfocitos T que son específicos para el epítopo del polipéptido multimérico mediante el ensayo de una muestra que comprende una población mixta de linfocitos T, la cual comprende linfocitos T que no son específicos para el epítopo (linfocitos T no diana) y puede comprender linfocitos T que son específicos para el epítopo (linfocitos T diana). Pueden usarse ensayos conocidos para detectar la activación y/o proliferación de los linfocitos T diana, de esta manera se proporciona un ensayo *ex vivo* que puede determinar si un polipéptido multimérico particular (synTac) posee un epítopo que se une a linfocitos T presentes en el individuo y, por lo tanto, si es posible que el polipéptido multimérico tenga potencial uso como una composición terapéutica para dicho individuo. Los ensayos conocidos adecuados para la detección de activación y/o proliferación de linfocitos T diana incluyen, por ejemplo, caracterización citométrica de flujo del fenotipo de linfocitos T y/o especificidad y/o proliferación de antígeno. Un ensayo tal para detectar la presencia de linfocitos T específicos del epítopo, por ejemplo, un diagnóstico adicional, puede incluir además ensayos adicionales (por ejemplo, ensayos ELISpot de citocina efectora) y/o controles adecuados (por ejemplo, reactivos de tinción de péptido multimérico de HLA específicos para el antígeno y no específicos para el antígeno) para determinar si el polipéptido multimérico se une/activa y/o expande el linfocito T diana de forma selectiva. Por lo tanto, por ejemplo, la presente descripción proporciona un método para detectar, en una población mixta de linfocitos T obtenida de un individuo, la presencia de un linfocito T diana que se une a un epítopo de interés en una población mixta de linfocitos T que se obtiene de un individuo, el método comprende: a) poner la población mixta de linfocitos T en contacto *in vitro* con un polipéptido multimérico de la presente descripción, en donde el polipéptido multimérico comprende el epítopo de interés y b) detectar la activación y/o proliferación de linfocitos T en respuesta a dicho contacto, en donde los linfocitos T activados y/o proliferados indican la presencia del linfocito T diana. Alternativamente, y/o además, si la activación y/o expansión (proliferación) de la población de linfocitos T deseada se obtiene mediante el uso del polipéptido multimérico, entonces toda o una porción de la población de linfocitos T que comprenden los linfocitos T activados/expandidos puede administrarse nuevamente al individuo (que ha recibido la administración de un inhibidor de punto de control antes de la administración de los linfocitos T y/o recibirá la administración de un inhibidor de punto de control después de la administración de los linfocitos T) como una terapia.

En algunos casos, la población de linfocitos T se encuentra *in vivo* en un individuo. En dichos casos, un método de la presente descripción para suministrar de forma selectiva un polipéptido coestimulador (por ejemplo, IL-2 o IL-2 con afinidad reducida) a un linfocito T específico para el epítopo comprende administrar el polipéptido multimérico al individuo.

También se hace referencia al linfocito T específico para el epítopo al cual se administra de forma selectiva un polipéptido coestimulador (por ejemplo, IL-2 o una IL-2 con afinidad reducida) como un "linfocito T diana." En algunos casos, el linfocito T diana es un linfocito T regulador ("Treg"). En algunos casos, el Treg inhibe o elimina la actividad de un linfocito T autorreactivo.

En algunos casos, el linfocito T diana es un linfocito T citotóxico. Por ejemplo, el linfocito T diana puede ser un linfocito T citotóxico específico para un epítopo de cáncer (por ejemplo, un epítopo presentado por una célula cancerosa).

65 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se brindan a efectos de proporcionarles a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo elaborar y usar la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran la invención ni se pretende establecer que los experimentos más abajo sean todos o los únicos experimentos realizados. Se ha intentado asegurar la exactitud de los números que se utilizan (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta un margen de error y desvío experimental. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es atmosférica o similar. Pueden usarse abreviaturas estándares, por ejemplo, pb: par(es) de bases, kb: kilobase(s); pl: picolitro(s), s o seg: segundo(s), min: minuto(s), h o hr: hora(s), aa: aminoácido(s), kb: kilobase(s), pb: par(es) de bases, nt: nucleótido(s), kDa: kiloDanton(s), i.m.: intramuscular o por vía intramuscular, i.p.: intraperitoneal o por vía intraperitoneal, s.c: subcutánea o por vía subcutánea y similares.

Ejemplo 1: Producción de IL-2/synTac.

15 Se analizó la producción de IL-2/synTac mediante células de mamíferos transfectadas de forma transitoria. Tal como se ilustra en la Figura 7A, los niveles de producción (en mg/l de medio de cultivo) de dos IL-2/synTac diferentes, 6-7 días después de la transfección transitoria de las células, fueron mayores de 90 mg/l.

20 Las IL-2/synTac producidas por las células de mamíferos se purificaron y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con reducción y sin reducción. Los resultados se representan en la Figura 7B. Los tamaños se indican en kDa.

25 Se generaron IL-2/synTac, en las cuales el polipéptido de IL-2 se encontró en la "cadena ligera" (es decir, el polipéptido que comprendía la cadena ligera de MHC clase I, por ejemplo, β2M) o en la "cadena pesada" (es decir, el polipéptido que comprendía la cadena pesada de MHC clase I). Se analizaron los niveles de expresión y estabilidad de las IL-2/synTac.

30 Los synTac se produjeron en células de mamíferos. Tal como se ilustra en la Figura 8A, la IL-2/synTac que comprende IL-2 en la cadena pesada se produjo en niveles alrededor de 25 veces mayores que el nivel de la IL-2/synTac que comprende IL-2 en la cadena ligera.

35 Las IL-2/synTac producidas por células de mamíferos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con reducción y sin reducción, y los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Tal como se ilustra en la Figura 8B, la IL-2/synTac que comprende IL-2 en la cadena pesada fue más estable que la IL-2/synTac que comprende IL-2 en la cadena ligera. Los tamaños se indican en kDa.

40 Se evaluaron los niveles de expresión de las IL-2/synTac que comprenden IL-2 variante. La Figura 9 representa el nivel de expresión de IL-2/syn-Tac, en el que la IL-2 es de tipo salvaje (wt), o comprende varias combinaciones de F42A, D20K, Q126A, E15A, Y45A y H16A. Los niveles de expresión se expresan como por ciento de cambio con relación a niveles de expresión de un synTac con IL-2 de tipo salvaje.

45 Se evaluó el efecto de la cantidad de copias de IL-2 en una IL-2/synTac en los niveles de expresión. IL-2/synTac que comprendían una copia (1X), dos copias (2X) o tres copias (3X) en el synTac. Las diversas IL-2/synTac se produjeron en células de mamíferos y se evaluaron sus niveles de expresión. Los datos se representan en la Figura 10. Las IL-2/synTac con una o dos copias de IL-2 exhibieron niveles de expresión similares, al tiempo que una IL-2/synTac con tres copias de IL-2 exhibió niveles de expresión menores. Los niveles de expresión se expresan como cambio en veces con relación al nivel de expresión de la IL-2/synTac con una sola copia de IL-2.

Ejemplo 2: Actividad *in vitro* de IL-2/synTac.

50 Para lograr la especificidad máxima en la selección de la dianas a través de un receptor de linfocitos T, la afinidad del polipéptido coestimulador por su ligando debe ser menor que la afinidad de MHC por el TCR. La afinidad de péptido/MHC por TCR puede ser alrededor de 10 μM.

55 Se generó una IL-2/synTac que comprendía dos copias de una IL-2 variante que comprendía sustituciones F42A y H16A. Se evaluó la señalización coestimuladora inducida por IL-2/synTac en linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno y linfocitos T CD8⁺ no específicos. Los linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno y los linfocitos T CD8⁺ no específicos se pusieron en contacto con varias concentraciones de IL-2/synTac.

60 Tal como se ilustra en la Figura 11, IL-2/synTac indujo señalización coestimuladora en linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno a una concentración mucho menor que en linfocitos T CD8⁺ no específicos.

65 Se evaluó la selectividad de unión de IL-2/synTac. Los linfocitos T CD8⁺ se aislaron de bazos de ratones LCMV u OT1. Los linfocitos T CD8⁺ se incubaron con IL-2/synTac a varias concentraciones y se permitió su unión durante 20 minutos. Las IL-2/synTac comprenden Fc de IgG2a. Se detectó la unión de IL-2/synTac a los linfocitos T CD8⁺

mediante el uso del anticuerpo anti-IgG2a etiquetado con ficoeritrina (PE). La fluorescencia de PE se detectó mediante el uso de citometría de flujo para determinar el por ciento de células unidas a IL-2/synTac.

Tal como se muestra en la Figura 12, IL-2/synTac se une de forma específica para el antígeno a linfocitos T CD8⁺ de LCMV, pero no exhibe unión significativa a linfocitos T CD8⁺ de OT1. Por lo tanto, IL-2/synTac se une selectivamente a linfocitos T CD8⁺ específicos para el epítopo presente en la IL-2/synTac.

Se determinó si una IL-2/synTac activa selectivamente los linfocitos T diana. Los linfocitos T CD8⁺ se aislaron de bazos de ratones LCMV u OT1. Las IL-2/synTac usadas incluyeron ya sea la sustitución de aminoácidos única F42A o las sustituciones F42A y H16A. Los linfocitos T CD8⁺ se estimularon con IL-2/synTac a varias concentraciones durante 20 minutos. Luego, las células se tiñeron con anticuerpo antifosfo-STAT5 etiquetado con PE. La fluorescencia de PE se detectó mediante el uso de citometría de flujo para determinar el por ciento de células positivas para fosfo-STAT5, donde fosfo-STAT5 es un marcador de activación.

Tal como se ilustra en la Figura 13, IL-2/synTac indujo la estimulación de CD8⁺ (tal como lo indica el % de células positivas para fosfo-STAT5) en linfocitos T CD8⁺ (LCMV) específicos para el antígeno a concentraciones mucho menores que en linfocitos T CD8⁺ (BL6) no específicos.

Se analizó la actividad específica de varias IL-2/synTac. Se evaluaron las IL-2/synTac que comprendían una sola copia de IL-2, dos copias de IL-2 o tres copias de IL-2, donde la IL-2 comprendía varias combinaciones de sustituciones F42A, D20K, Q126A, E15A, H16A y Y45A, a varias concentraciones para la estimulación de linfocitos CD8⁺ específicos para el antígeno (LCMV) o no específicos (BL6). Se determinó el por ciento positivo para fosfo-transductor de señal y activador transcripcional 5 (pSTAT5). Los datos se representan en la Figura 14A-14F.

Ejemplo 3: Actividad *in vivo* de IL-2/synTac.

Se evaluó la actividad *in vivo* de IL-2/synTac. Se evaluó el cambio en veces *in vivo* en linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno luego de la administración de solución salina amortiguada con fosfato (PBS), rIL-2 recombinante (rIL-2) o una IL-2/synTac de la presente descripción. Los datos se ilustran en la Figura 15, panel izquierdo. Los datos indican que IL-2/synTac es 10 veces más potente que rIL-2.

Se evaluó la especificidad *in vivo* de IL-2/synTac. Se evaluaron las respuestas específicas para el antígeno y no específicas para el antígeno luego de la administración de PBS, rIL-2 o IL-2/synTac. Los datos se expresan como por ciento de células de ganglios linfáticos específicas para el antígeno o no específicas para el antígeno luego de la administración de PBS, rIL-2 o IL-2/synTac. Tal como se representa en la Figura 15, panel derecho, IL-2/synTac indujo una respuesta específica para el antígeno (expresada como % de dilución máxima de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE), un índice de proliferación de linfocitos T). Por el contrario, la respuesta inducida por rIL-2 no fue específica para el antígeno.

Se llevó a cabo un ensayo de respuesta a la dosis. Se administró IL-2/synTac (F42A, H16A) de forma intraperitoneal a concentraciones de 4 mg/kg, 8 mg/kg y 16 mg/kg. Los resultados se muestran en la Figura 16A. Tal como se muestra en la Figura 16A, IL-2/synTac administrado a 4 mg/kg u 8 mg/kg produjo resultados similares e IL-2/synTac administrado a 16 mg/kg indujo la actividad inmunoestimuladora más potente.

Se evaluó el efecto de la vía de administración de IL-2/synTac. IL-2/synTac (F42A, H16A) se administró a 4 mg/kg, ya sea de forma subcutánea (SubQ) o intraperitoneal (IP). Tal como se ilustra en la Figura 16B, la administración subcutánea generó una actividad inmunoestimuladora más potente que la administración IP.

Se determinó el efecto de la cantidad de copias de IL-2 en la eficacia. Se inyectaron IL-2/synTac que comprenden una sola copia de IL-2 (F42A, H16A) o dos copias de IL-2 (F42A, H16A) en ratones con tumores con un epítopo E7 de HPV. El epítopo incluido en las IL-2/synTac fue el epítopo E7 de HPV. Tal como se ilustra en las Figuras 17A y 17B, una IL-2/synTac que comprende dos copias de IL-2 (F42A, H16A) fue más efectiva para reducir el tamaño tumoral que una IL-2/synTac que comprende únicamente una sola copia de IL-2 (F42A, H16A).

Ejemplo 4: PK/PD y estudios de estabilidad de IL-2/synTac.

Se llevó a cabo un análisis de farmacocinética (PK) de IL-2/synTac. Se administró IL-2/synTac (F42A, D20K, H16A) de forma IP a 10 mg/kg. En varios momentos posteriores a la administración, se obtuvieron muestras de suero y se midió el nivel de IL-2/synTac en las muestras de suero. Tal como se ilustra en la Figura 18, la semivida en suero de la IL-2/synTac fue de alrededor de 4 horas.

Se inyectó IL-2/synTac de forma IP en un ratón C57BL/6 a 10 mg/kg y se recogió suero dos horas después de las inyecciones. La IL-2/synTac incluyó una etiqueta His₆. Se sometieron 100 ng de la proteína de entrada o el equivalente de 40 µl de suero a electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se analizaron con sonda con un anticuerpo anti-(His)₆ o un anticuerpo anti-β2M. Los resultados, representados en la Figura 19, muestran que IL-2/synTac permanece estable e intacta durante al menos 2 horas *in vivo*.

Se mantuvo la IL-2/synTac a 4 °C o 37 °C durante 5 días. Se analizaron 0,5 mg de cada muestra (a 10 mg/ml) mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Tal como se muestra en la Figura 20, IL-2/synTac se mantiene estable e intacta durante al menos 5 días a 4 °C o 37 °C.

Ejemplo 5: Efecto de una IL-2/synTac y un anticuerpo anti-PD1 sobre el volumen tumoral.

Como se muestra en la Figura 35, la administración de una IL-2/synTac y un anticuerpo anti-PD1 a un ratón que tiene un tumor, redujo el volumen tumoral.

Ejemplo 6: Generación y caracterización de polipéptidos synTac con la variante 4-1BBL.

Los polipéptidos synTac se sintetizaron y caracterizaron. Los siguientes polipéptidos synTac se evaluaron para determinar la actividad en linfocitos T específicas de ovoalbúmina (OVA):

1) Syn83/51. La cadena ligera de Syn83/51 comprende: a) un epítopo de linfocitos T OVA; b) los aminoácidos 50-254 de un polipéptido 4-1BBL de tipo salvaje; y c) β2M; y la cadena pesada de Syn83/51 comprende: a) la cadena pesada de MHC; y b) Fc de Ig.

2) Syn239/345. La cadena ligera de Syn239/345 comprende: a) un epítopo de linfocitos T OVA; b) un trímero de aminoácidos 80-254 de 4-1BBL de tipo salvaje; y c) β2M; y la cadena pesada de Syn239/345 comprende: a) la cadena pesada de MHC; y b) Fc de IgG2a.

3) Syn341/348. La cadena ligera de Syn341/348 comprende: a) un epítopo de linfocitos T OVA; b) un trímero de 4-1BBL de tipo salvaje; y c) β2M; y la cadena pesada de Syn239/345 comprende: a) la cadena pesada de MHC; y b) Fc de IgG2a. En Syn341/348 la primera unidad del trímero 4-1BBL comprende los aminoácidos 50-254 de 4-1BBL de tipo salvaje; la segunda y tercera unidades del trímero 4-1BBL comprenden los aminoácidos 80 a 254 de 4-1BBL de tipo salvaje.

4) Syn341/349. La cadena ligera de Syn341/349 comprende: un epítopo de linfocitos T OVA; b) un trímero de los aminoácidos 80-254 de 4-1BBL que comprende una sustitución K127A en cada unidad del trímero, con un enlazador GlySerSerSer entre la primera y segunda unidades y entre la segunda y tercera unidades del trímero; y c) β2M; y la cadena pesada de Syn239/345 comprende: a) la cadena pesada de MHC; y b) Fc de IgG2a.

Los heterodímeros synTac resultantes se cultivaron *in vitro* con linfocitos T específicos de ovoalbúmina durante 3 días o 5 días, a concentraciones de 0, 1, 3, 17, 10, 01, 31, 65 y 100 nM de synTac. Los controles incluyeron: a) medio solo; b) forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y el ionóforo A23187; y c) un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28.

Después de 3 días, y después de 5 días, se determinó la concentración de IFN-γ, IL-2, IL-6, TNF, IL-10, IL-17A e IL-4 en el medio de cultivo. Además, se determinó la viabilidad de los linfocitos T específicos de OVA y la proliferación de los linfocitos T específicos de OVA.

Los datos se representan en las Figuras 38-46.

Como se muestra en las Figura 38 a la Figura 46, Syn 341/349 induce la producción de IL-2 (una citocina de aptitud biológica celular); induce la producción de citocinas citotóxicas TNFα e IFN-γ; y también induce la proliferación y potencia la viabilidad de los linfocitos T específicos del epítopo.

Ejemplo 7: Producción de synTac en células CHO.

Los SynTac que comprenden 4-1BBL de tipo salvaje (wt), o que comprenden 4-1BBL con sustituciones de aminoácidos como se expone en la Figura 47 se expresaron transitoriamente en células CHO. Se determinó la cantidad de synTac producido. Las cantidades producidas se proporcionan en la Figura 47.

Ejemplo 8: Efecto *in vivo* de un synTac de 4-1BBL.

Un synTac que comprende un péptido antigénico E7 del virus del papiloma humano (HPV) y una variante de 4-1BBL K127A de la presente descripción (denominada "CUE:4-1BBL (K127A)" en la Figura 48) se administró a 5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal (IP) en ratones portadores de carcinoma de pulmón de HPV⁺ TC-1 injertado en flanco. Como control, se administró solución salina tamponada con fosfato (PBS) a ratones portadores del mismo tumor. Como se muestra en la Figura 48, el volumen tumoral disminuyó en ratones tratados con CUE:4-1BBL (K127A), en comparación con ratones tratados con PBS. Ejemplo 9: Efectos *in vivo* de la coadministración de un synTac de 4-1BBL y un inhibidor de punto de control inmunitario.

Como se representa en la Figura 49, la coadministración de un synTac de 4-1BBL de la presente descripción y un anticuerpo anti-PD1 redujo el volumen tumoral en un modelo de tumor de ratón, y aumentó el por ciento de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que eran granzima B⁺.

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a sus modalidades específicas, los expertos en la técnica comprenderán que pueden realizarse diversos cambios. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de proceso particulares, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polipéptido multimérico para el uso en un método para tratar un cáncer asociado al virus del papiloma humano (HPV) en un paciente humano, el método comprende administrar un polipéptido multimérico y un inhibidor de punto de control inmunitario,
en donde el polipéptido multimérico comprende un heterodímero que tiene:
 - a) un primer polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:
 - i) un epítopo de HPV16 E7 que comprende la secuencia de aminoácidos YMLDLQPETT (SEQ ID NO:77);
 - ii) un primer polipéptido del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que es un polipéptido β 2-microglobulina (β 2M) que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 34A (SEQ ID NO:48); y
- 10 b) un segundo polipéptido que comprende, en orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal:
 - i) un polipéptido de IL-2 variante, que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34B (SEQ ID NO: 49);
 - ii) un segundo polipéptido de MHC que es un polipéptido de cadena pesada de MHC clase I que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 34C (SEQ ID NO:50); y
 - 15 iii) un polipéptido Fc de inmunoglobulina (Ig).
2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en la Figura 4A (SEQ ID NO:21).
3. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el polipéptido Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33A (SEQ ID NO:44), 33B (SEQ ID NO:45), 33C (SEQ ID NO:46) o 33D (SEQ ID NO:47).
4. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el polipéptido Fc de Ig es un polipéptido Fc de IgG1 que comprende una sustitución L234A y una sustitución L235A (L14A y L15A en base a la numeración de aminoácidos representada en la Figura 33A).
5. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polipéptido Fc de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 33D (SEQ ID NO:47).
6. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el segundo polipéptido comprende dos copias del polipéptido de IL-2 variante.
7. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el primer polipéptido comprende un enlazador peptídico entre el epítopo y el polipéptido β 2M.
8. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el segundo polipéptido comprende un enlazador peptídico entre uno o más de:
 - a) una primera copia del polipéptido de IL-2 variante y una segunda copia del polipéptido de IL-2 variante;
 - b) el polipéptido de IL-2 variante y el polipéptido de cadena pesada de MHC; y
 - c) entre el polipéptido de cadena pesada de MHC y el polipéptido Fc de IgG1.
9. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde cada enlazador peptídico se selecciona independientemente de $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:207), $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:208) y AAAGG (SEQ ID NO:73).
10. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 31 (SEQ ID NO:42) y en donde el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 25 (SEQ ID NO:36).
11. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición comprende un homodímero que comprende dos moléculas del polipéptido multimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde las dos moléculas del polipéptido multimérico se unen entre sí por disulfuro a través del polipéptido Fc de Ig presente en las dos moléculas.

12. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el cáncer asociado a HPV se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de cuello uterino y un cáncer genitoanal.
- 5 13. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo específico para PD1.
14. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo específico para PD1 se selecciona de pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab y BMS-39886.
- 10 15. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el individuo se ha vuelto resistente a un tratamiento previo contra el cáncer o en donde el individuo no ha respondido a un tratamiento previo contra el cáncer.
- 15 16. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran por la misma vía de administración.
- 20 17. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran mediante diferentes vías de administración.
- 25 18. Una composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la composición que comprende el polipéptido multimérico y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran por una vía de administración seleccionada de subcutánea, intravenosa, peritumoral e intramuscular.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

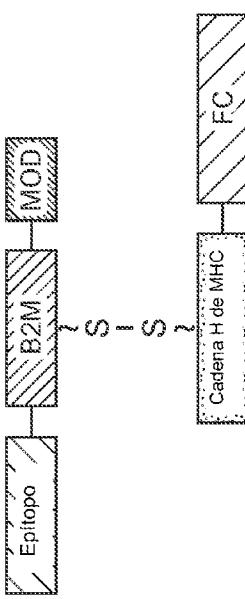


FIGURA 1C

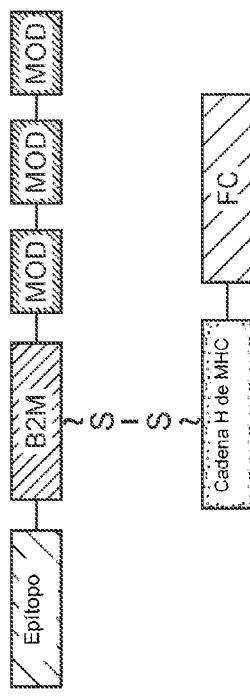


FIGURA 1B

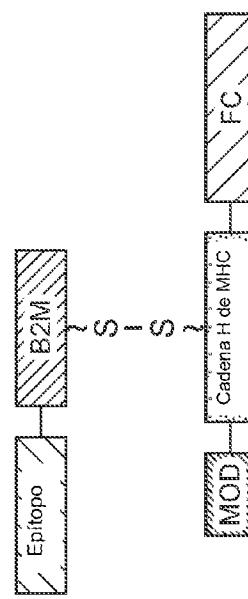


FIGURA 1D

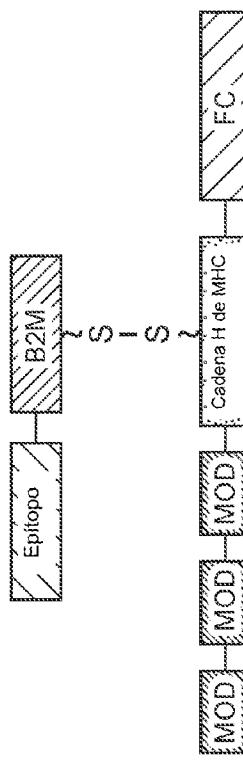


FIGURA 2A

IL2 – *Homo sapiens*

APTSSTKKT QLQLE**H**LLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML T**F**KFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFC**Q**SIIS TLT (SEQ ID NO:1)

FIGURA 2B

IL2 (F42X)

APTSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML T**X**KFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFC**Q**SIIS TLT (SEQ ID NO:2)

FIGURA 2C

IL2 (D20X)

APTSSTKKT QLQLEHLL**X** LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFC**Q**SIIS TLT (SEQ ID NO:3)

FIGURA 2D

IL2 (E15X) }

APTSSTKKT QLQL**X**HLDD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFC**Q**SIIS TLT (SEQ ID NO:4)

FIGURA 2E

IL2 (H16X)

APTSSSSTKKT QLQLEXLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:5)

FIGURA 2F

IL2 (Y45X)

APTSSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:6)

FIGURA 2G

IL2 (Q126X)

APTSSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT (SEQ ID NO:7)

FIGURA 2H

IL2 (F42X; H16X)

APTSSSSTKKT QLQLEXLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:8)

FIGURA 2I

IL2 (F42X; D20X)

APTSSTKKT QLQLEHLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:9)

FIGURA 2J

IL2 (F42X; D20X; E15X)

APTSSTKKT QLQLXHLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:10)

FIGURA 2K

IL2 (F42X; D20X; H16X)

APTSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:11)

FIGURA 2L

IL2 (F42X; D20X; Q126X)

APTSSTKKT QLQLEHLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEVN NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TTGFMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT (SEQ ID NO:12)

FIGURA 2M

IL2 (F42X; D20X; Y45X)

APTS SSKKT QLQLEHLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TT FMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:13)

FIGURA 2N

IL2 (F42X; D20X; Y45X; H16X)

APTS SSKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TT FMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:14)

FIGURA 2O

IL2 (F42X; D20X; Y45X; Q126X)

APTS SSKKT QLQLEHLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TT FMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT (SEQ ID NO:15)

FIGURA 2P

IL2 (F42X; D20X; Y45X; H16X; Q126X)

APTS SSKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TT FMCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT (SEQ ID NO:16)

FIGURA 2Q

IL2 - (F42X; H16X; Q126X)

APTSSTKKT QLQLEX~~L~~LD LQMILNGINN YKNPKLTRML T~~X~~KFYMPKKA TELKHLQCLE
EELKPLEEV~~L~~ NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELGSE TT~~F~~MCEYADE TATIVEFLNR
WITFCXSIIS TLT (SEQ ID NO: 17)

FIGURA 3A

Cadena IL2R-alfa
Homo sapiens

1 **MDSYLLMWGL LTTFIMVPGCQ AELCDDDPPE** IPHATFKAMA YKEGTMLNCE CKRGFRRRIKS
 61 GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSSATRNT TKQVTTPQPEE QKERKTTEMQ SPMQPVDQAS
 121 LPGHCREPP WENEATERIY HFVVGQMYY QCVQGYRALH RGPAESVCKM THGKTRWTQP
 181 QLICCTGEMET SQFPGEEEKPQ ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ
 241 VAVAGCVFLL ISVILLSSGLT WQRQRKSRR TI (SEQ ID NO:18)

Madura = aminoácidos 22-272

FIGURA 3B

Cadena IL2R-beta
Homo sapiens

1 MAAPALSWRL PLLILLPLA TSWASAAYNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ DGALQDTSCQ
 61 VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWAGCNLL GAPDSQQLLT VDIVTILRVLC REGVRWRVMA
 121 IQDFKPFEENL RIMAPISLQV VHVETHRNCI SWEISQASHY FERHLFEAR TLSPGHTWEE
 181 APILTILKQKQ EWICLETLTP DTQYEQVRR KPLQGEFTTW SPWSQPLAFLR TKPAALGKDT
 241 IPWLIGHLLVG LSGAAGFIIIL VYLLINCRNT GPWLKVKLKC NTPDPSKFFS OLSSEHGGDV
 301 QKWLSSPFPS SSFSPPGLAP EISPLEVLER DKVTQILLQQ DVKVEPEASLS SNHSILTSCT
 361 NQGYFFHLPL DALEIEACQV YFTYDPYSEE DPDEGVAGAP TGSSPQPLQP LSGEDDDAYCT
 421 FPSRDDLLIF SPSILLGGPSP PSTAPGGSGA GEERMPPSLQ ERVPFRWDPQ PLGPPTPGVP
 481 DLVDFQPPP E LVLRAGEEEV PDAGPREGVS FPWSRPPGQG EFRALNARLP LNTDAYLSLQ
 541 EIQQQDPTHLV (SEQ ID NO:19)

Madura = aminoácidos 27-551

FIGURA 3C

Cadena IL2R-gamma
Homo sapiens

1	MLKPSLPPFTS	LLFLQLPLIG	VGLNTTILTP	NGNEDTTADF	FLTTMPTDSL	SVSTLPLPEV
61	QCFVENVYEM	NCTWNNSSEP	QPTNLTLHYW	YKNSDNDKVQ	KCSHYLFSEE	ITSGCQLQKK
121	EIHLYQTFVV	QLQDPREPRR	QATQMLKLQN	LVIPWAOPENL	TLHKLSESQL	EINWNNNRFLN
181	HCLEHLVQYR	TDWDHSWTEQ	SVDYRHKFSL	PSVUDGQKRYT	FRVRSRFNPL	CGSAQHWS EW
241	SHPIHWGSNT	SKENPFLFAL	EAVVISVGSM	GLIISLLCVY	FWLERTMPRI	PTLKNLEDLV
301	TEYHGNESAW	SGVSKGLAES	LQPDYSERLC	LVSEIIPPKGG	ALGEGPAGSP	CNQHSPYWAP
361	PCYTTLKPET	(SEQ ID NO:20)				

Madura ≈ aminoácidos 22-369

FIGURA 4A
GenBank 3S7G_A
Fc de IgG1 de *Homo sapiens* (SEQ ID NO:21)
227 aa

```

1 dkthtcppcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvvdvshed pevkfnwyvd
61 gvehnaktk preeqynsty rvsvltvh qdwlingkeyk ckvsnkalpa piektiskak
121 qqprepqvyt lppsrdeltk nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn yktppvlds
181 dgsfflyskl tvdksrwqgg nfscsvmhe alhnhytqks ls1spqk

```

GenBank AAN76044
Fc de IgG2 de *Homo sapiens* (aminoácidos 99-325) (SEQ ID NO: 22)
227 aa

```

1 stkgpsvfpl apcsrstsae taalglcvkd yfpepytvsw nsgaltsgvn tfpav1qssg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvrdhkpsn tkvdktverk ccvecppcpa ppvaagpsvfl
121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vqfnwyvdgv evhnaktkpr eeqfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlnqkeykck vsnkglpapi ektisktkgg prepqvytlp psreemtng
241 vs1tclvkgf ypsdiavew sngqpennyk ttppmlsdg sfflyskltv dksrwqqgnv
301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk

```

GenBank AAN76044
Fc de IgG3 de *Homo sapiens* (aminoácidos 19-246) (SEQ ID NO:23)
238 aa

```

1 hkposntkvdk rvelktp1gd tthtcppcpa pellggpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc
61 vvvvdvshedp evkfnyyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vvsvltvlhq dwlngthkeykc
121 kvsnkalpap iektiskakg qprepqvytl ppsrdeltn qvs1tclvkg fypsdiaiew
181 esngqpenny kttppvldsg gsfflysklt vdksrwqgn vfscsvmheal lhnhytqks1
241 slspqk

```

FIGURA 4B

GenBank AAA52770
Fc de IgD de Homo sapiens (aminoácidos 19-246) (SEQ ID NO:24)
222 aa

1 ptkapdvvfpi isgcrhpkdn spvvvlaclit gyhpptsvtvtyymgtqssqq rtfpeiqrrd
61 syymtssqls tplsqqwrqge ykcvvvqhtas kskkeifrwp espkaqassv ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkkekkeeq eeretktpec pshtqp1gvy lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgsd1kdah ltwevagkvp tggyveegille rhnsngsqsh srltlprslw
241 nagtsvtctl nhpslppqr1 malrepaqaqapvklslnlla ssdppeaaww llcevsgfsp
301 pnillmwled grevntsfga parpppprs ttflwawsblr vpappspqa tytcvvshed
361 srtllnasrs levsyvtdhg pmk

GenBank 0308221A
Fc de IgD de Homo sapiens (SEQ ID NO: 25)
276 aa

1 vtstltikzs dwlgessmftc rvdhrgltfq qmassmcvpd qdtairvfai ppsfasiflt
61 kstklclvt dltybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavage asicedbds
121 gerftctvh tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbyyllppa rzzlnlresa titclvtgfs
181 padvfewmq rgeplspqky vtsapmppepq apgryfahsi ltvseewnt ggttytcvvvan
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvslvmsd tagtcy

FIGURA 4C

GenBank P01876
Fc de IgA de *Homo sapiens* (aminoácidos 120-353) (SEQ ID NO:26)
234 aa

1 asptspkvpfp 1s1cstqpdg nvviac1vqg ffpqepolsvt wsesggqvta rnfppsqdas
61 gddlyttssql tlpataqclag ksvtchvkhv tnpqdvtvp cpvpstpptp spstpptpsp
121 schpr1slh rpaledllg seanltctlt glrdasgvtf twtpssqksa vqgpperdlc
181 gcyssvssvlp gcaeapwnhgk tftctaaype sktpltatls ksntfrpev hllpppseel
241 ainelvtltc largfspkdv lvrwlqgsqe lprekyltwa srqepsqgtt tfavtsilrv
301 aaedwkkqdt fscomvgheal plaf tqktid rlagkpthvn vsvvmaevdg tcy

GenBank 1F6A B
Fc de IgE de *Homo sapiens* (aminoácidos 6-222) (SEQ ID NO: 27)
212 aa

1 adpcdsnprg vsaylsrpsp fd1firkspt itclvvdlap skgtvnltws rasgkpvnhs
61 trkeekqring tlvtstlpv gtrdwieget yqcrvthphl pralmrsttk tsgpraapev
121 yafatpewpg srdkr1lac1 iqnmfpedis vqw1hnnevq1 pdarhsttqp rktkgsgffv
181 fsrlevtiae weqkdeficr avheaaspsq tvgravsvnp qk

GenBank P01861
Fc de IgG4 de *Homo sapiens* (aminoácidos 100-327) (SEQ ID NO: 28)
228 aa

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpav1qss
61 glyss1ssvvt vpssslgtkt ytcnydhkps ntkvdkrves kyqppcpscp apeflggpsv
121 flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvvdvsqed pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty
181 rvvsv1tv1h qdw1ngkeyk ckvsnkglps siektiskak qqprepqvyt lppsqueentk
241 nqvs1tclvk gfypsdiave wesngqpenn yktppvlds qgsfflysr1 tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alhnhytqks ls1s1qk

FIGURA 5A

Homo sapiens
GenBank NP_001229687
HLA-A
Aminoácidos 25-365 (SEQ ID NO:29)

1 mavmaprtll lllsgalalt gttwagshsmr yfftsvsrpg rgeprfiavg yvddtqfvrf
61 dsdaasqkme prapwieqeg peywdqetrn mkahtsqtdra nlgtlrgyyn qsedgshtiq
121 imygcdvgpd grflrgyrgd aydgkdyial nedlrswwaa dmaaqitkrk weavhahaegr
181 rvylegrcvd glrrylengk et1qrtdppk thmthhpisd heatlrcwai gfyypaeitlt
241 wqrldgedqtq dtelvetrpa gdgtfqkwa a vvvpsgeegr yttchvqhegl pkpltlrwel
301 ssqstvpiwg iiaqlvllga vitgavvaav mwrrkssdark ggsytqaass dsaqgsdws1
361 tackv

FIGURA 5B

Homo sapiens
GenBank NP_005505
HLA-B
Aminoácidos 25-362 (SEQ ID NO: 30)

1 mlvmaprtvl lllsaalalt ettwagshsmr yfytsvsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaaspree prapwieqeg peywdrntqi ykaqaqtdre slrnrlrgyyn qseagsht1q
121 smygcdvgpd grllrghdqy aydgkdyial nedlrswwaa dtaaqitqrk weaareaeqr
181 raylegecve wlrrylengk dkleradppk thvthhpisd heatlrcwai gfyypaeitlt
241 wqrldgedqtq dtelvetrpa gdrtfqkwa a vvvpsgeegr yttchvqhegl pkpltlrwep
301 ssqstvpiwg ivaglavav mcrirkssggk ggsysqaacs dsaqgsdws1
361 ta

FIGURA 5C

Homo sapiens
GenBank NP_001229971
HLA-C
Aminoácidos 25-366 (SEQ ID NO: 31)

1 mrvmaprall lllsgqlalt etwacshsmr yfdtavsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaasprge prapwveqeg peywdretqn ykrqaqadrv slrnrlrgyn qsedgshtlq
121 rmygcdlqpd grllrgydyq dqs aydgkdyial nedlrshtaa dtaaqitqqrk leaaraaeql
181 raylegtcve wlrrylengk et1qraeppk thvthhp1sd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrddgedqtq dtelvetrpa gdgtfqkwaa vvvpsggqegr ytchmquegl qepltlswep
301 ssqptipimg ivaglavvv lavglavvv mmcrkssgg kggscsqaac snsaaqggsdes
361 litcka

FIGURA 6

FIGURA 7A

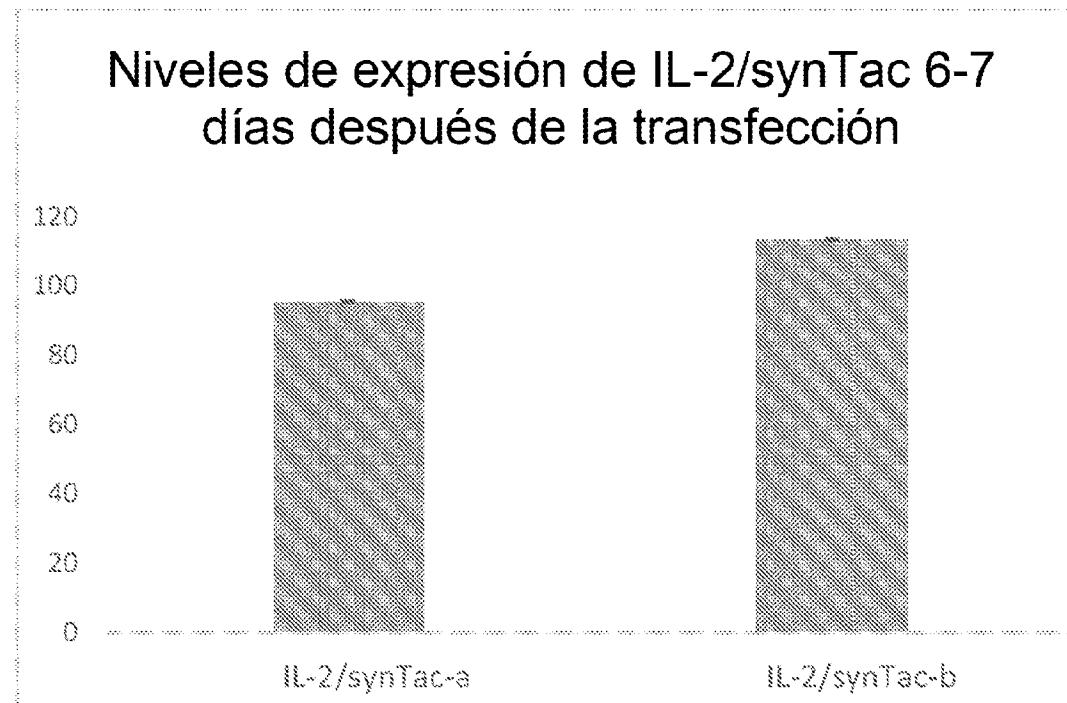


FIGURA 7B

Producto purificado

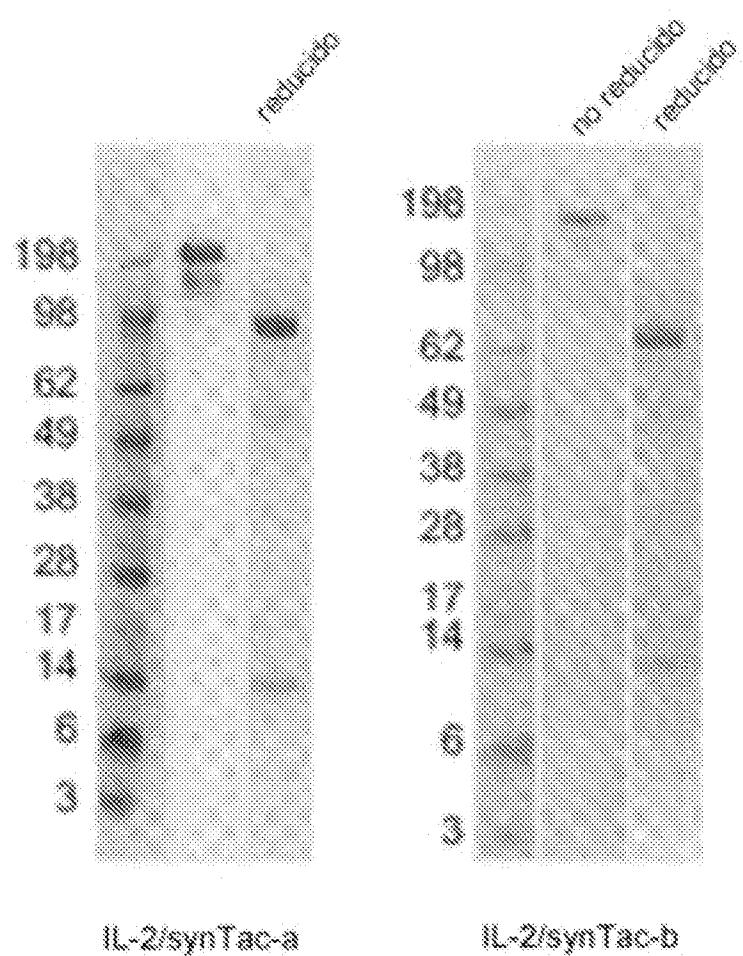


FIGURA 8A

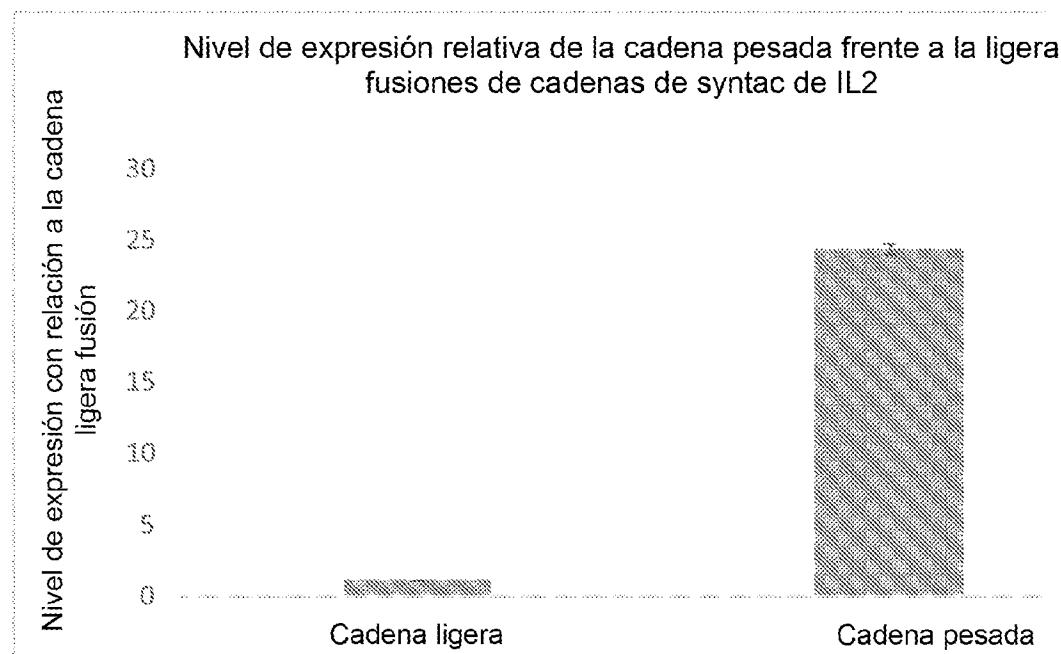
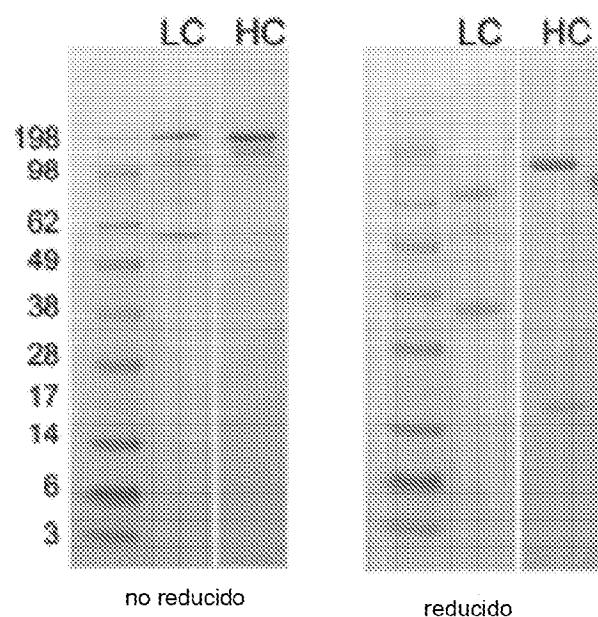


FIGURA 8B

Mayor estabilidad con la fusión de cadenas pesadas



Geles analíticos teñidos con Coomassie

FIGURA 9

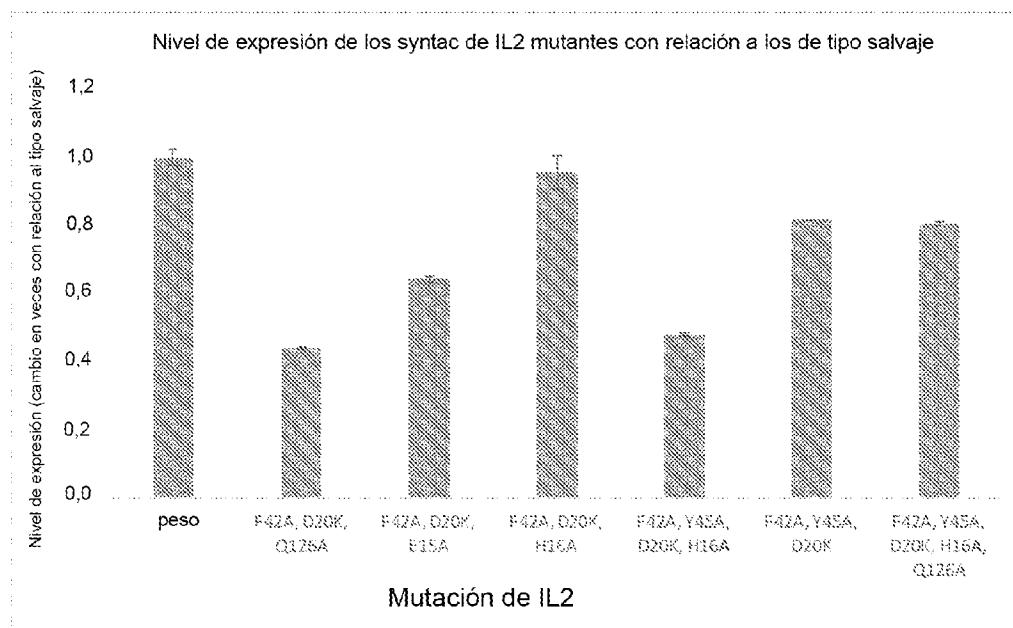


FIGURA 10

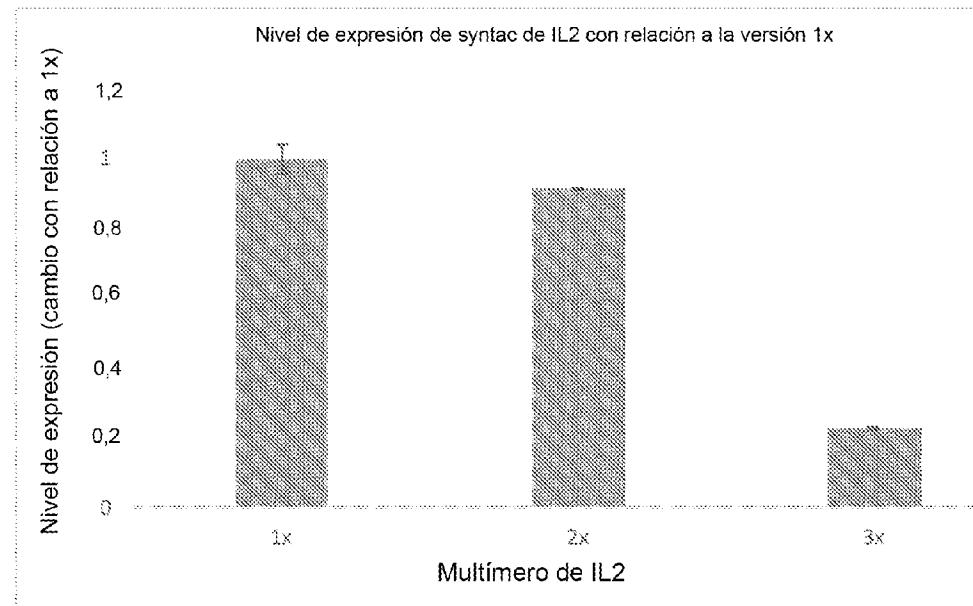


FIGURA 11

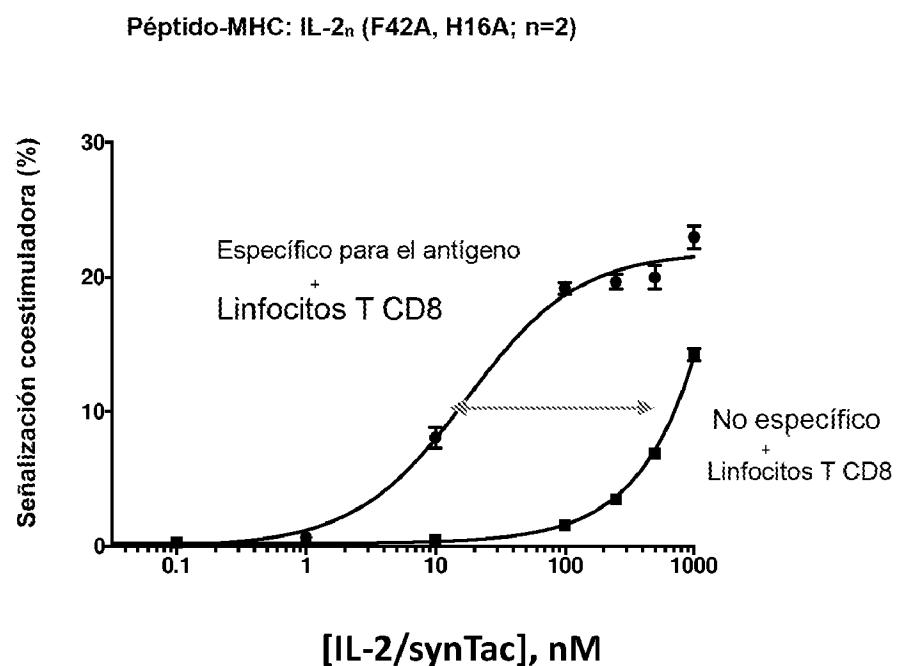


FIGURA 12

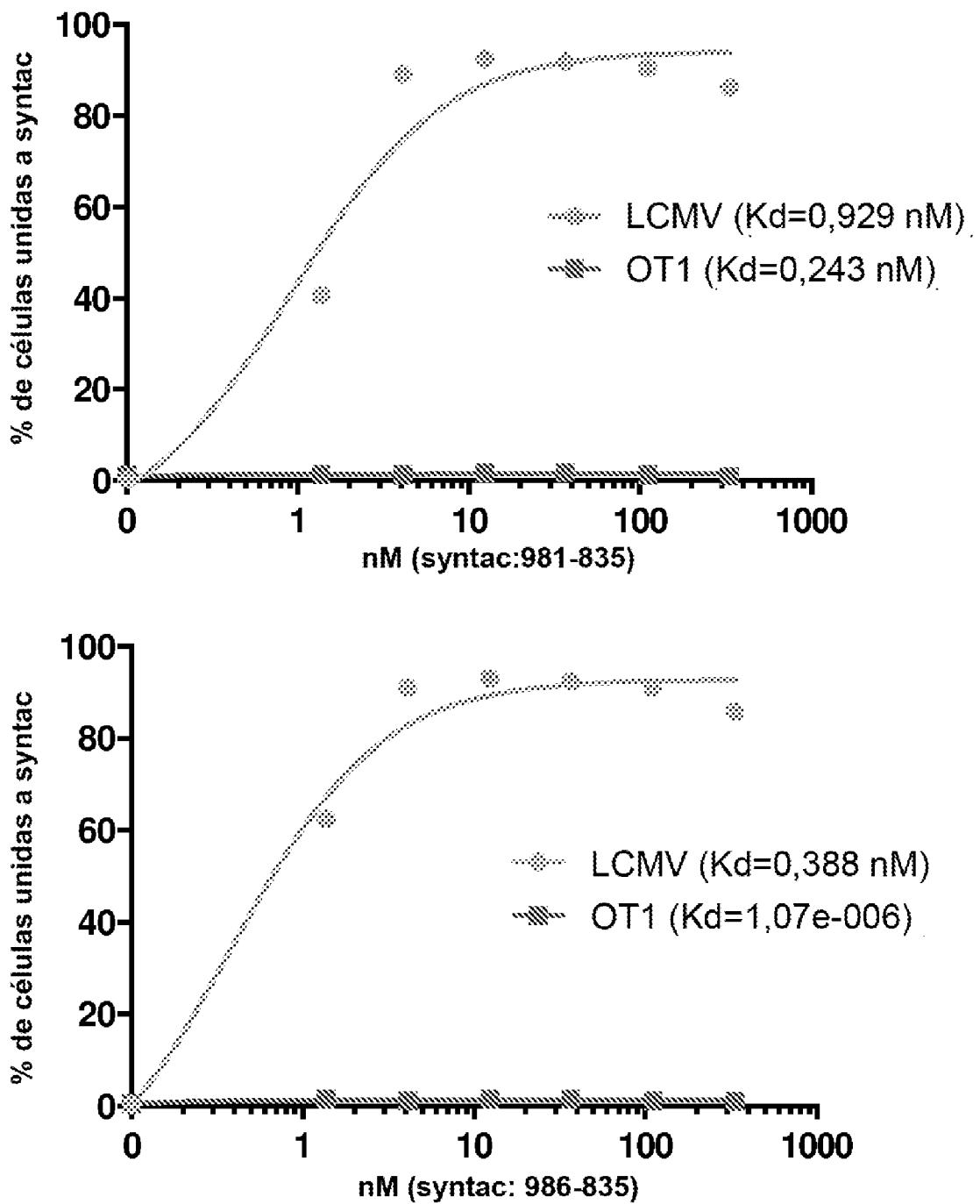


FIGURA 13

Número de repeticiones de IL-2 frente a mutaciones

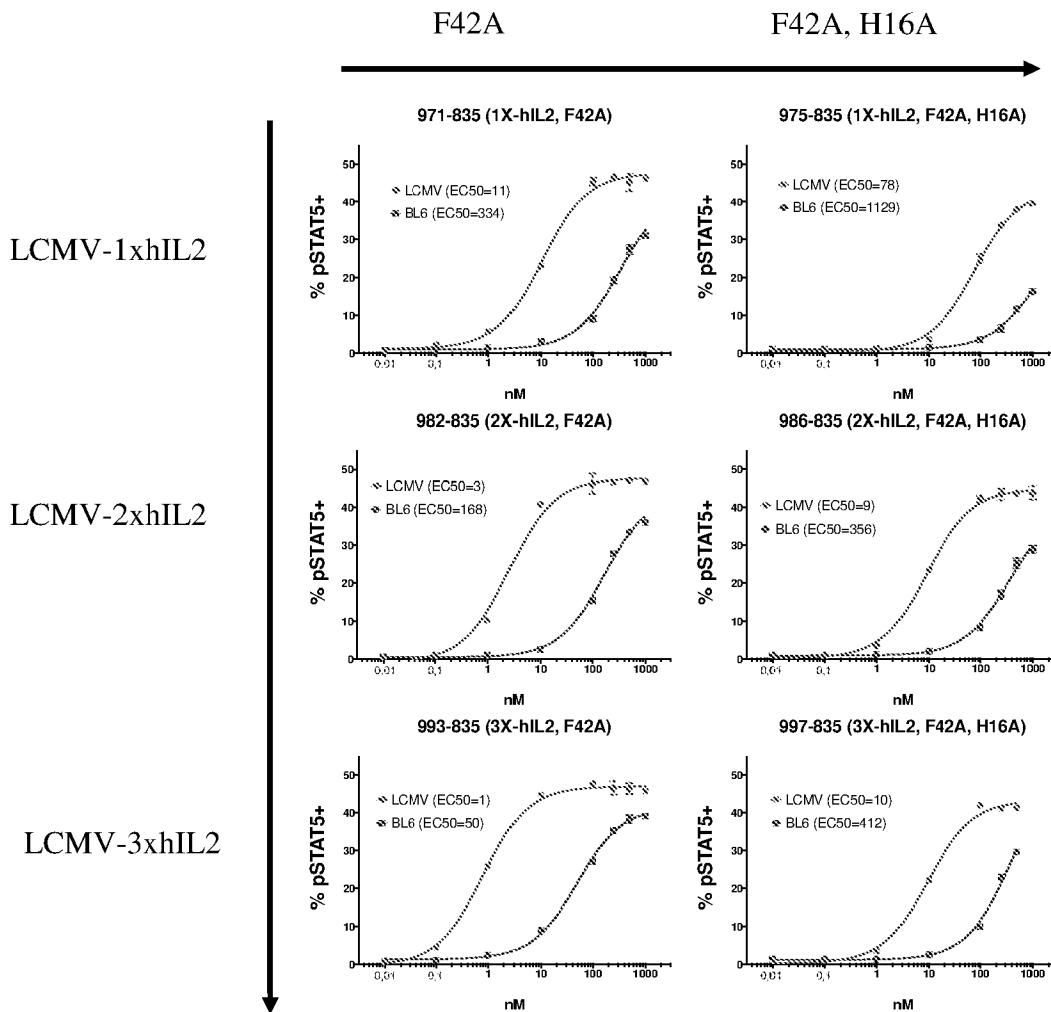
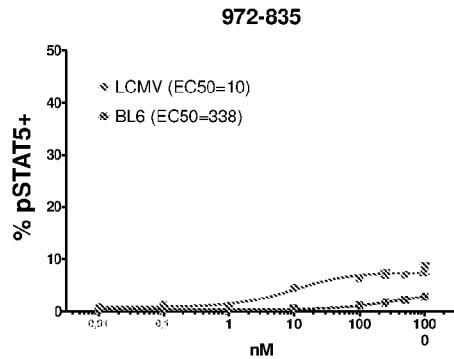


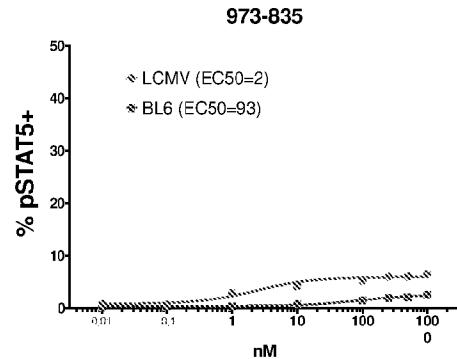
FIGURA 14A

Una copia de IL-2

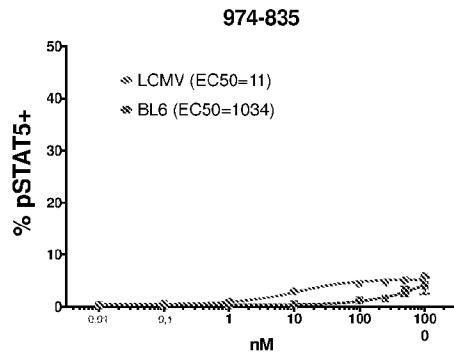
Mutación: F42A, D20K



Mutación: F42A, D20K, Q126A



Mutación: F42A, D20K, E15A



Mutación: F42A, D20K, H16A

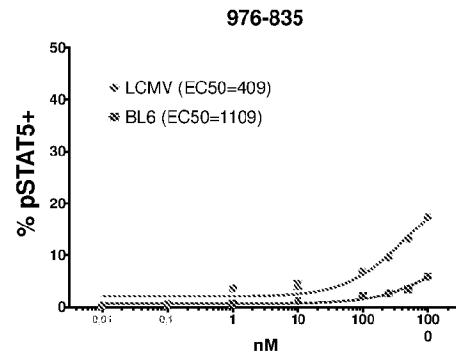
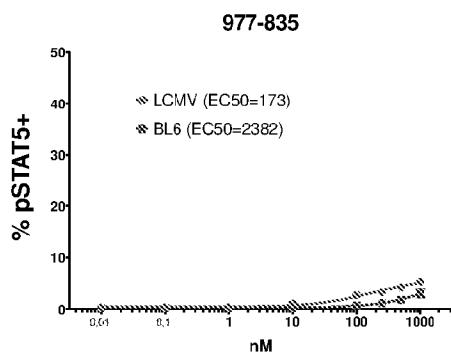


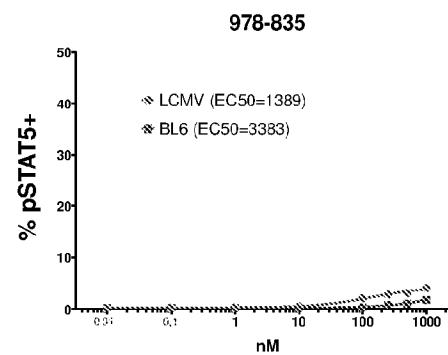
FIGURA 14B

Una copia de IL-2

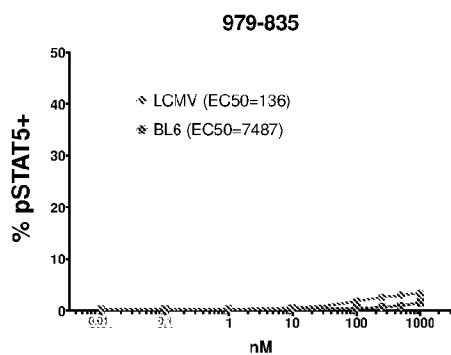
Mutación: F42A, Y45A, D20K, H16A



Mutación: F42A, Y45A, D20K



Mutación: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



Mutación: F42A, Y45A, D20K, Q126A

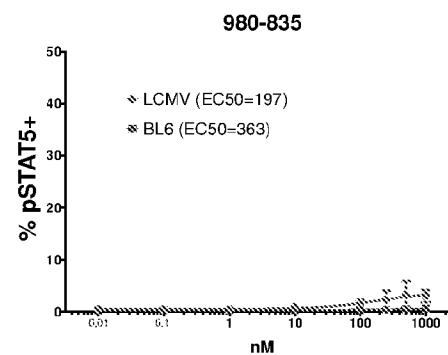
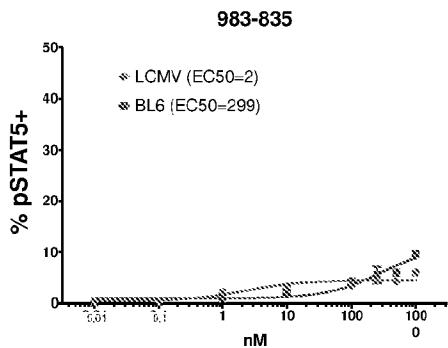


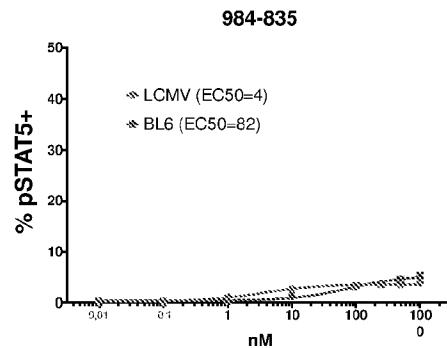
FIGURA 14C

Dos copias de IL-2

Mutación: F42A, D20K



Mutación: F42A, D20K, Q126A



Mutación: F42A, D20K, H16A

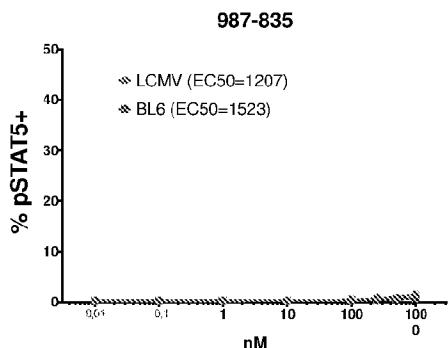
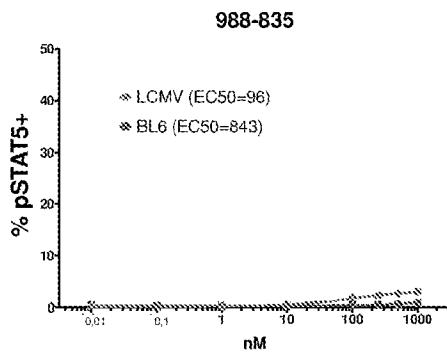


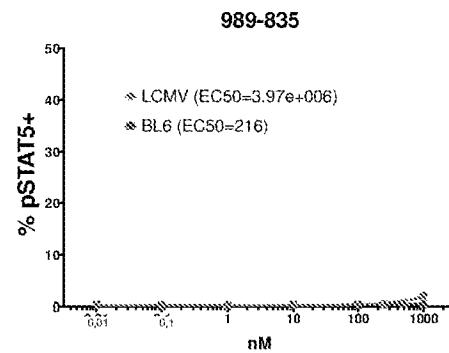
FIGURA 14D

Dos copias de IL-2

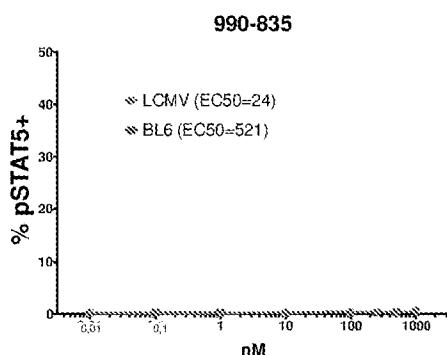
Mutación: F42A, Y45A, D20K, H16A



Mutación: F42A, Y45A, D20K



Mutación: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



Mutación: F42A, Y45A, D20K, Q126A

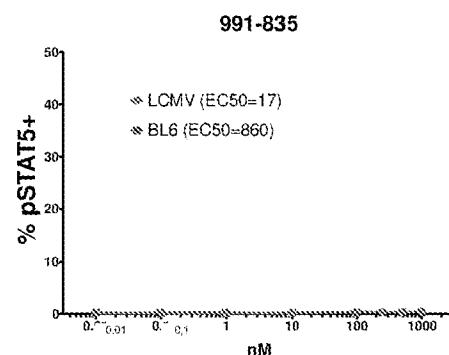
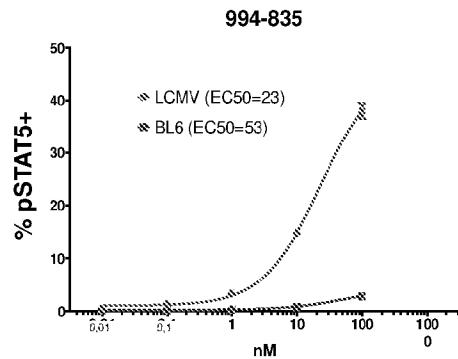


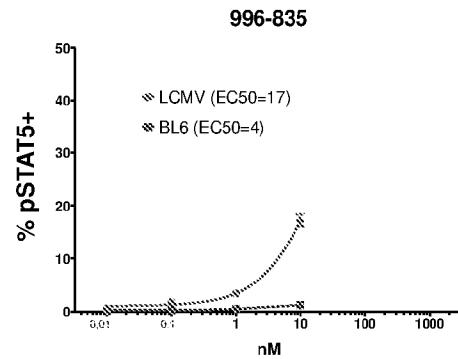
FIGURA 14E

Tres copias de IL-2

Mutación: F42A, D20K



Mutación: F42A, D20K, E15A



Mutación: F42A, D20K, H16A

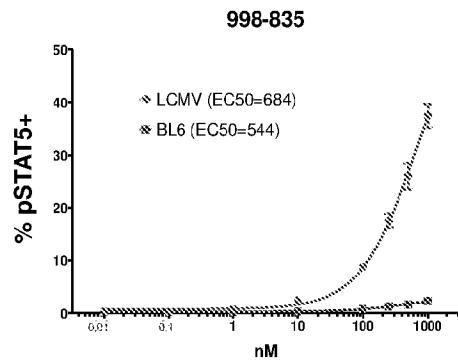
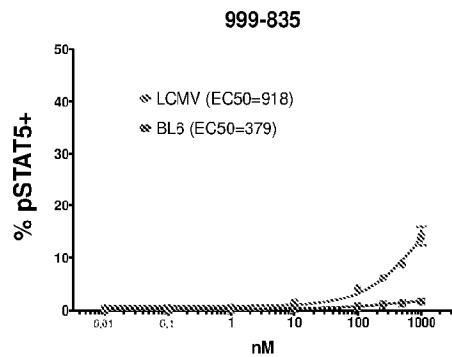


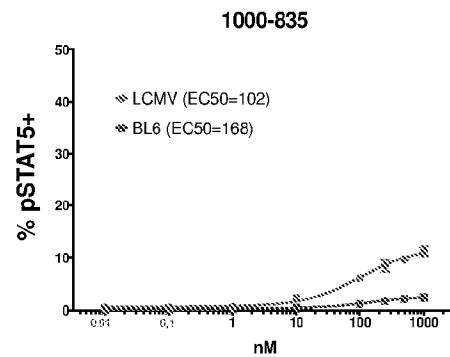
FIGURA 14F

Una copia de IL-2

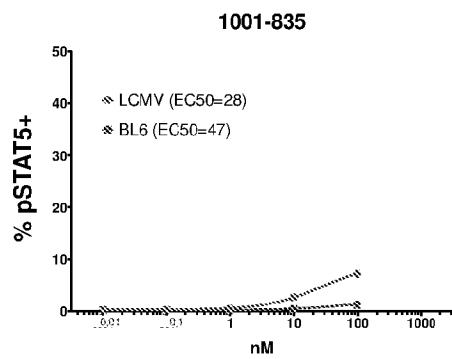
Mutación: F42A, Y45A, D20K, H16A



Mutación: F42A, Y45A, D20K



Mutación: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



Mutación: F42A, Y45A, D20K, Q126A

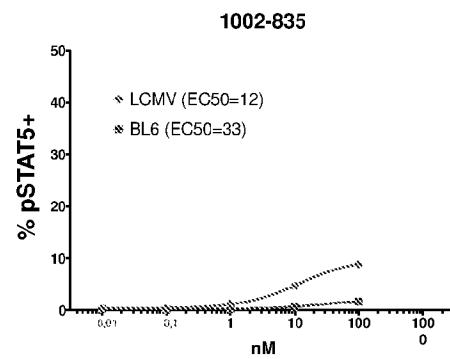


FIGURA 15

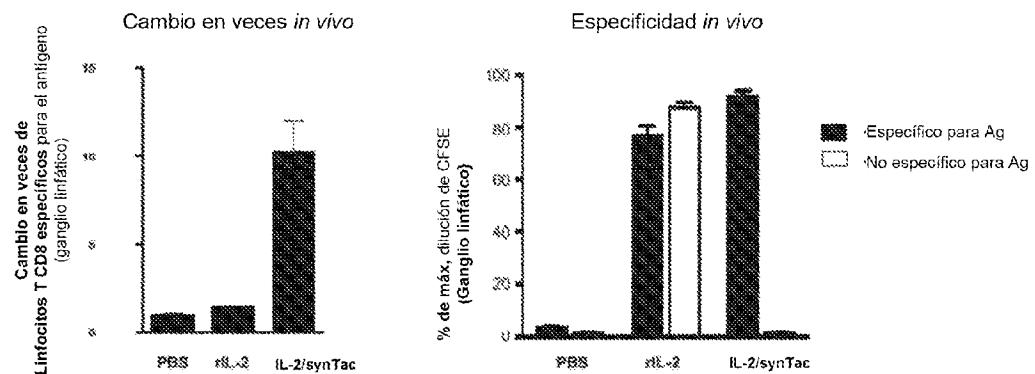


FIGURA 16A

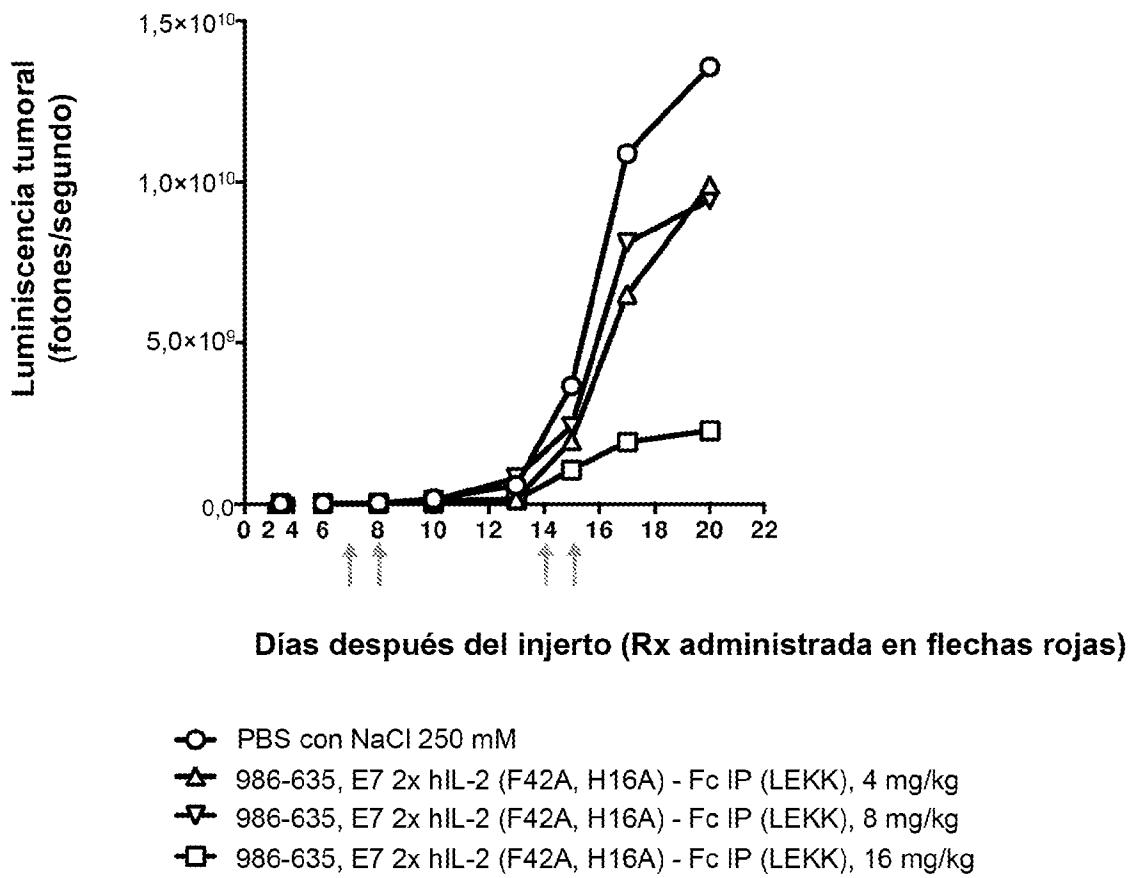


FIGURA 16B

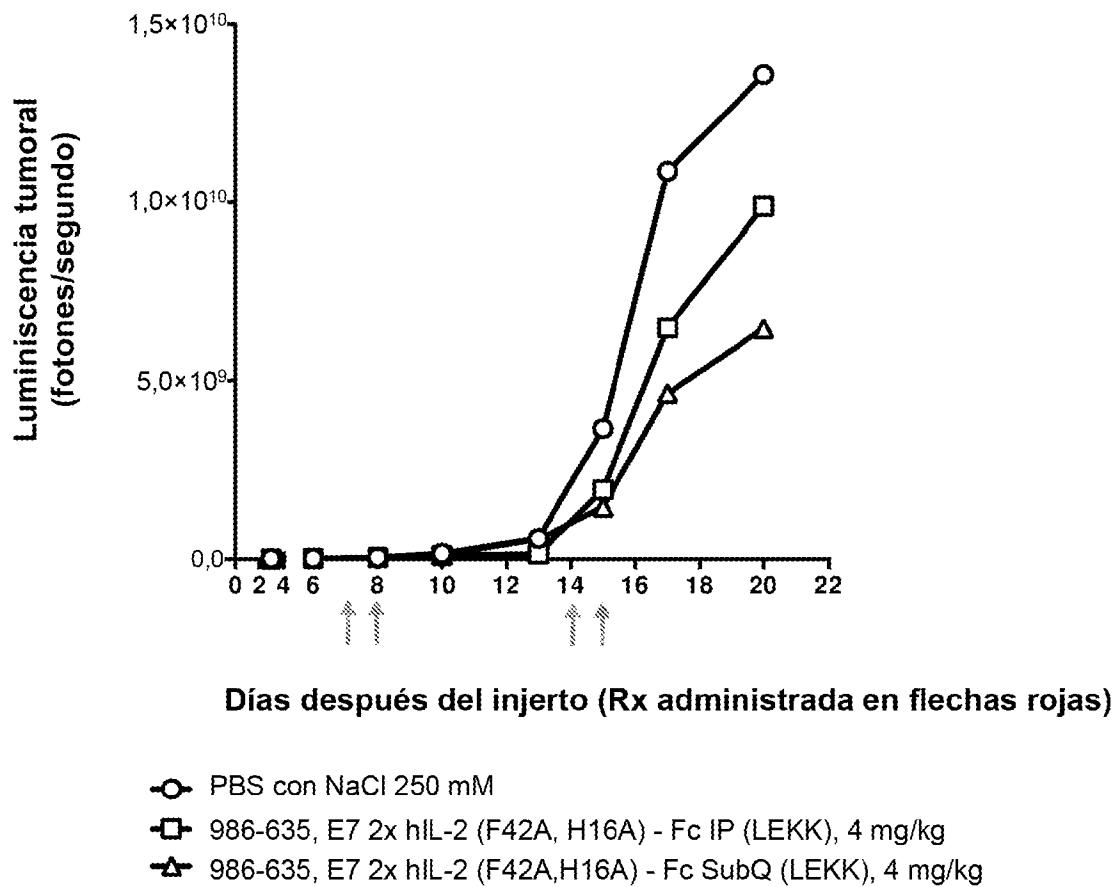


FIGURA 17A

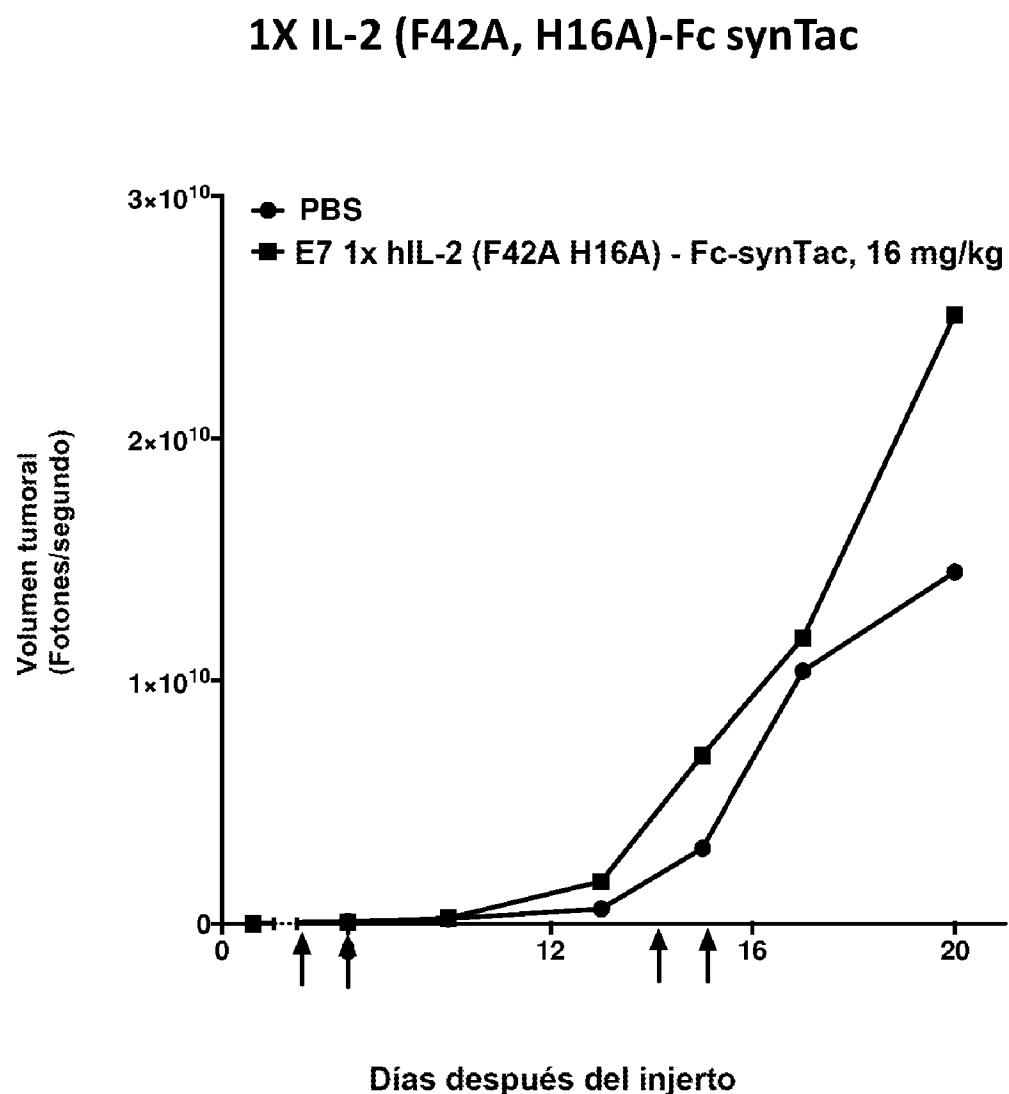


FIGURA 17B

2X IL-2 (F42A, H16A)-Fc synTac

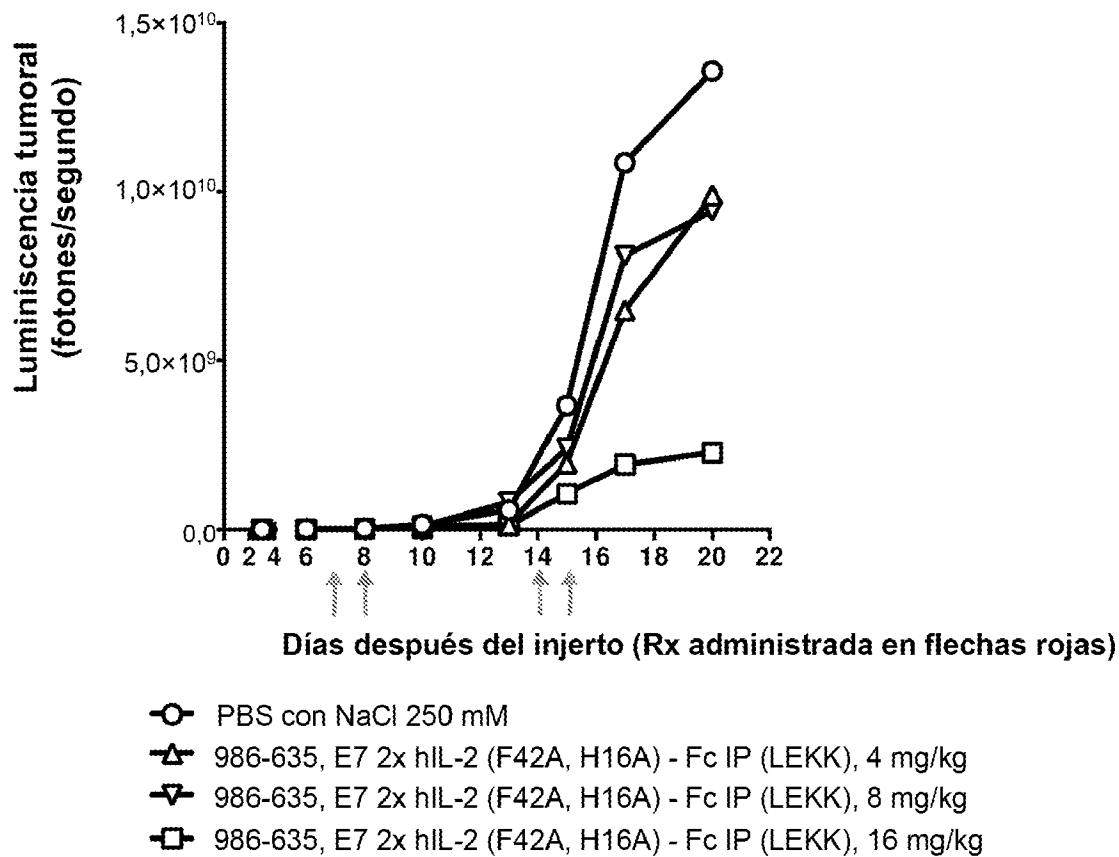


FIGURA 18

976-835 LCMV-hIL-2 (F42A, D20K:H16A) (10 mg/kg, IP)

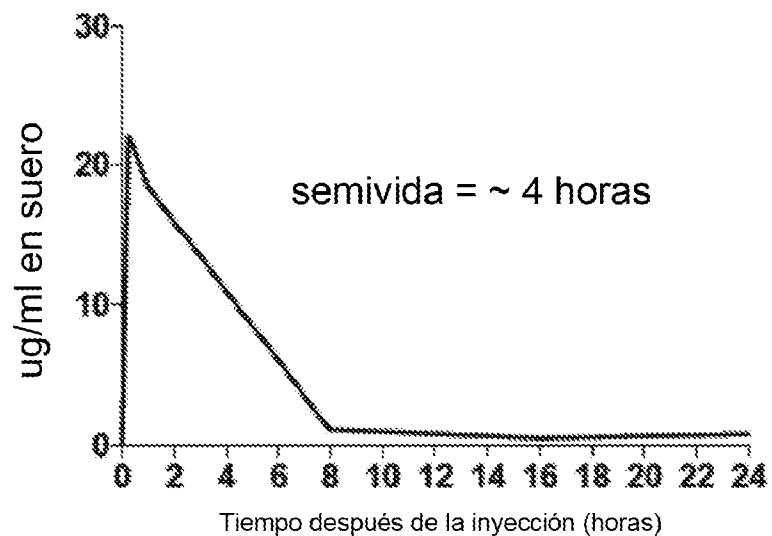


FIGURA 19

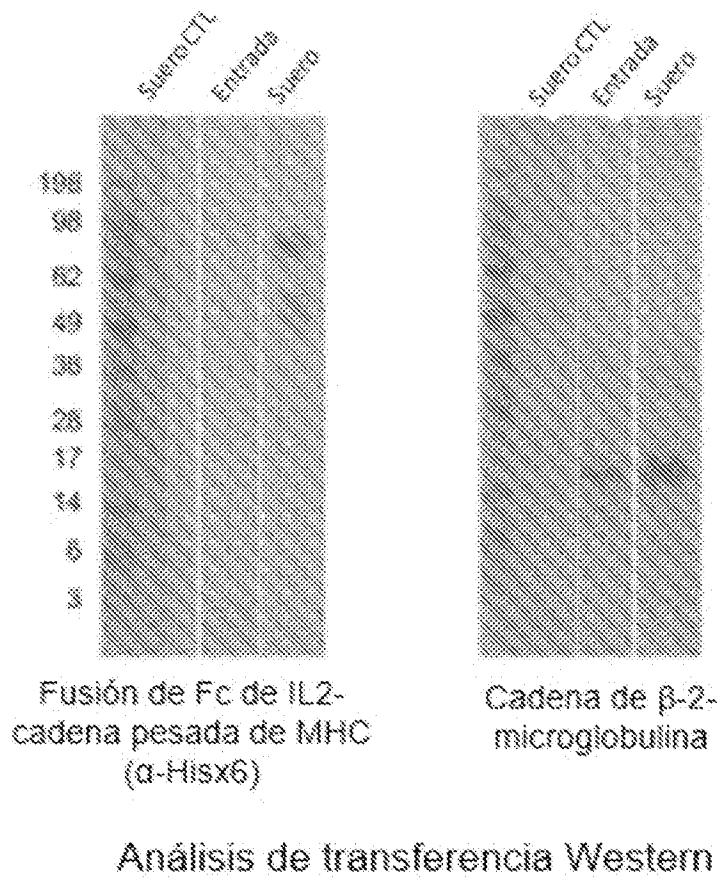


FIGURA 20

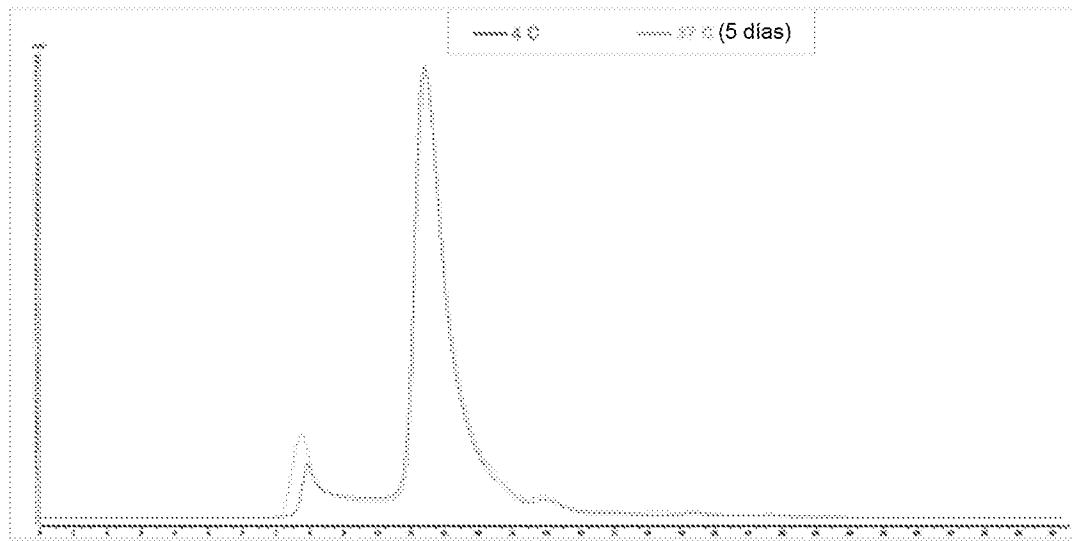


FIGURA 21 (SEQ ID NO:32)

CUE101-N297A con péptido líder

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSSKNFHLPRPRDLISNINVIVLELGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE
EVLNLAQSSKNFHLPRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSOTHRVDLGTLRGAYNQSEAGSHT
VORMYGCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE
OLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDQTQDTTELVERTRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEORYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFCSVMEALHNHYTQKSLSSLSPGK

Secuencia líder de IL2 humana - cursiva

IL-2 (H16A/F42A) - en negrita (con H16 y F42 subrayados)

Enlazadores (G4S)4 - subrayado único

Cadena H de MHC Y84A; A236C - subrayado doble (con Y84A y A236C en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; N297A - (en negrita y subrayado, con N297A sin negrita)

FIGURA 22 (SEQ ID NO:33)

CUE101-N297A sin péptido líder

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSSKNFHLPRPRDLISNINVIVLELGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE
EVLNLAQSSKNFHLPRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSOTHRVDLGTLRGAYNQSEAGSHT
VORMYGCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE
OLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDQTQDTTELVERTRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEORYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFCSVMEALHNHYTQKSLSSLSPGK

IL-2 (H16A/F42A) - en negrita (con H16 y F42 subrayados)

Enlazadores (G4S)4 - subrayado único

Cadena H de MHC Y84A; A236C - subrayado doble (con Y84A y A236C en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; N297A - (en negrita y subrayado, con N297A sin negrita)

|FIGURA 23A (SEQ ID NO:34)

CUE101-N297A

1360:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGCTTGCATTGCACTAAGTCTGCACTTGCACAAACAGTGACCTACTTC
AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACAGTGGAGGATTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATG
GAATTATAATTACAAGAACATCCAAACTCACCAAGGATGCTACAGAAGTTTACATGCCAAGAAG
GCCACAGAACTGAAACATCTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATT
AGCTCAAAGCAAAACTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA
ACTAAAGGGATCTGAAACAAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATTTC
TGAACAGATGGATTACCTTGTCAAAGCATCATCTAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGT
GAGGTTCTGGTGGTGGGGATCTGGAGGCAGGATCTGCACCTACTCAAGTTCTACAAAGAAAACA
CAGCTACAACGGAGGATTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGAAATTATAATTACAAGAAT
CCCAAACTCACCAAGGATGCTACAGAAGTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTT
CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTAGCTCAAAGCAAAACTTC
CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACAAAGGGATCTGAAACAA
CATTATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATTCTGAACAGATGGATTACCTTT
GTCAAAGCATCATCTAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA
TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACCCATGAGGTATTCTCACATCCGTGCCCCGGCCGGCG
GGGAGCCCCGCTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAAGTTCGTGCGGTCGACAGCGACGCCG
CGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGA
GACACGGAAAGTGAAGGCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGGACCCCTGCGCGCGCCTACA
ACCAGAGCGAGGCCGGTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGTGGACTGGCG
TTCCTCCGCGGGTACCAACCAAGTACGCCCTACGACGGCAAGGATTACATGCCCTGAAAGAGGACCTGCG
CTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAG
CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGAGATACTGGAGAACGGGAAGGA
GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAAACGATATGACTCACACGCTGTCTGACCATGAAGCCACC
CTGAGGTGCTGGCCCTGAGCTTACCCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGAGTGGGAGGA
CCAGACCCAGGACACGGAGCTGTGGAGACCAGGCCTTGCGGGGATGGAACCTCCAGAAGTGGCGG
CTGTGGTGGTGCCTCTGGACAGGAGCAGAGATAACCTGCCATGTGAGCATGAGGGTTGCCAAGC
CCCTCACCTGAGATGGAGGCAGCTGCGGGTGGCGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAGCAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGGTGACCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAAGTCCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAGTGA

FIGURA 23B

Secuencia líder de IL2 humana - cursiva

IL2 humana; H16A-**GCA**; F42A=**GCA** - en negrita (con GCA subrayada)

Enlazador (G4S)4 - subrayado único

A0201 Humano; Y84A=**GCC**; A236C=**TGC**

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; N297A=**GCA**; AGG a **AGA** (todavía R) y AGC a **TCC** (todavía S) - (en negrita y subrayado, con GCA en cursiva)

Codones de parada (TAGTGA)

FIGURA 24 (SEQ ID NO:35)

CUE101-LALA con péptido líder

MYRMQLLS**CIALSLAL**VNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS**KNFH**LPRDLISNINVIVLEKGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGGGSGGGGSGGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE
EVLNLAQS**KNFH**LPRDLISNINVIVLEKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNOSEAGSHT
VQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWAAHVAE
OLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPAEIT
LTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Péptido líder - en cursiva

IL-2 (H16A/F42A) – en negrita (con H16 y F42 subrayados)

Enlazadores (G4S)4 - subrayado único

Cadena H de MHC Y84A; A236C - subrayado doble (con Y84A y A236C en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; L234A; L235A - (en negrita y subrayado, con L234A y L235A sin negrita)

FIGURA 25 (SEQ ID NO:36)

CUE101-LALA sin péptido líder

APTS S S T K K T Q L Q L E A L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L
TAKF Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E
T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I I S T L T G G G G S G G G S G G G S G G G S A P T S S S T
K K T Q L Q L E A L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T A K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E
E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S
I I S T L T G G G G S G G G G S G G G S G G G S G H S M R Y F F T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V
R F D S D A A S Q B M E P R A P W I E Q E G P E Y W D G E T R K V K A H S Q T H R V D I G T L R G A Y N Q S E A G S H T
V Q R M Y G C D V G S D W R F L R G Y H Q Y A Y D G K D Y I A L K E D L R S W T A A D M A A Q T T K H K W E A A H V A E
Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L O R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T
L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P C G D G T F Q K W A A V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W
E A A A G G D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A I E K
T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

IL-2 (H16A/F42A) – en negrita (con H16 y F42 subrayados)

Enlazadores (G4S)4 - subrayado único

Cadena H de MHC Y84A; A236C - subrayado doble (con Y84A y A236C en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; L234A; L235A - (en negrita y subrayado, con L234A y L235A sin negrita)

FIGURA 26A (SEQ ID NO:37)

CUE101-LALA: secuencia de nucleótidos que codifica CUE101-LALA con péptido líder

AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGGCATACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATG
GAATTAATAATTACAAGAACATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACAGCAAAGTTTACATGCCAAGAAG
GCCACAGAACTGAAACATCTCAGTGTAGAAGAAGAACTCAAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATT
AGCTCAAAGCAAAACTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA
ACTAAAGGGATCTGAAACACATTCATGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATTTC
TGAACAGATGGATTACCTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGT
GAGGTTCTGGTGGTGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACA
CAGCTACAACTGGAGGCATACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAAATTAAATTACAAGAAT
CCCAAACTCACCAGGATGCTCACAGCAAAGTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTT
CAGTGTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTAGCTCAAAGCAAAACTTC
CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAA
CATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATTCTGAACAGATGGATTACCTTT
GTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA
TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACTCCATGAGGTATTCTCACATCCGTGCGGTTCGACAGCGACGCCG
CGAGCCAGAGGATGGAGGCCGCGGGCGCCGTGATAGACGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGA
GACACGGAAAGTGAAGGCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGACCCCTGCGCGGCCTACA
ACCAGAGCGAGGCCGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGTCGGACTGGCG
TTCCCTCGCGGGTACCCACCACTACGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCG
CTTGGACCCGCGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAGTGGAGGCGCCATGTGGCGAG
CAGTTGAGAGCCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA
GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAACGCATATGACTCACACCGCTGTCTGACCATGAAGCCACC
CTGAGGTGCTGGCCCTGAGCTACCCCTGAGCTTACCCTCGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGATGGGAGGA
CCAGACCCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTTGCGGGATGGAACCTCCAGAACGTTGGCGG
CTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATAACCTGCCATGTGCGACATGAGGGTTGCCAAGC
CCCTCACCCCTGAGATGGGAGGCAGCTGCGGTGGCACAAAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCA
CCTGAAGGGGGACCGTCAGTCTCCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACACAGCAC
GTACCGTGTGGCAGCGTCTCACCGCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCGCTGGAGTGGAGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCAACGCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGACAGATGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTGCACAAC
TACACGCAGAAGTCCCTCTCCGTCTCCGGTAAATAGTGA

FIGURA 26B

Secuencia líder de IL2 humana - cursiva

IL2 humana; H16A=**GCA**; F42A=**GCA** - en negrita (con GCA subrayada)

Enlazador (G4S)4 – subrayado único

A0201 Humano; Y84A = **GCC**; A236C =**TGC** – subrayado doble (con GCC y TGC en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; L234A, L235A = **GCCGCC**

N297=**AAC**; AGG a **AGA** (todavía R) y AGC a **TCC** (todavía S) - (en negrita y subrayado, con GCCGCC en cursiva)

Codones de parada (TAGTGA)

FIGURA 27 (SEQ ID NO:38)

CUE101-TM con péptido líder

MYRQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEALLLDLOMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLPRLISNINVIVLELKGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGGGSAPTSST
KKTQLQLEALLLDLOMILNGINNYKNPKLTEMILTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVNLAQSKNFHLPRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFTTSVRPGRGEPRFIAVGVYDDTQFV
RFDSDAASQRMEPAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGAYNQSEAGSH
VQRMYGCDVGSDWRFLRGHQYAYDGKDIALKEDLRSWTAAADMAAQTCHKWEEAHVAE
QLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWQRDGEDOTQDTTELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGGDKTHTCPGPCPAPEFEGGPSVFLFPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
TISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQSVLTCLVKGFPSSIAVEWESENQOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFSCCSVMEALHNHYTOKSLSLSPGK

Péptido líder - en cursiva

IL-2 (H16A/F42A) – en negrita (con H16 y F42 subrayados)

Enlazadores (G4S)4 - subrayado único

Cadena H de MHC Y84A; A236C - subrayado doble (con Y84A y A236C en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; L234F; L235E; P331S - (en negrita y subrayado, con L234F, L235E y P331S sin negrita)

FIGURA 28 (SEQ ID NO:39)
CUE101-TM sin péptido líder

APTSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVILELGSE
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE
EVLNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVILELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI
IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGSHSMRYFTTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV
RFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLRGAYNOSEAGSHT
VORMYGC DVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYLALKEDLRSWTADMAAQTTKHKWAAHVAE
QLRAYLEGTCVEWLRLRYLENGKETLORTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWORDGEDQTQDTTELVETRPCGDGTQKWAAVVPSGQEORYTCHVQHEGLPKPLTLRW
EAAAGG DKTHTCPCCPA PFE FEGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVK
FNWYVDGVEVHNNAKTKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
TISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK

IL-2 (H16A/F42A) – en negrita (con H16 y F42 subrayados)

Enlazadores (G4S)4 - subrayado único

Cadena H de MHC Y84A; A236C - subrayado doble (con Y84A y A236C en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; L234F; L235E; P331S - (en negrita y subrayado, con L234F, L235E y P331S sin negrita)

FIGURA 29A (SEQ ID NO:40)

CUE101-TM: secuencia de nucleótidos que codifica CUE101-TM con secuencia líder
ATGTACAGGATGCAACTCCTGTC~~T~~GCATTGCACTAAGTCTGCACTTGCAAAACAGTGCACCTACTTC
AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACA~~A~~CTGGAG~~G~~TTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATG
GAATTAATAATTACAAGAATCCAAACTCAC~~C~~ACAGGATGCTCACA~~G~~AAGTTTACATGCCAAGAAG
GCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGA~~A~~CTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATT
AGCTCAAAGCAAAACTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAA~~T~~AGTTCTGGA
ACTAAAGGGATCTGAAACAA~~C~~ATT~~C~~ATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATT
TGAACAGATGGATTACCTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGT
GAGGTTCTGGTGGTGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTG~~C~~ACCTACTTCAGTTCTACAAAGAAAACA
CAGTACA~~A~~CTGGAG~~G~~TTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAT
CCCAA~~A~~CTCAC~~C~~AGGATGCTCACA~~G~~AAGTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCT
CAGTGTCTAGAAGAAGA~~A~~CTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTAGCTCAAAGCAAAACTTCA
CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAA~~T~~AGTTCTGGA~~A~~CTAAAGGGATCTGAAACAA
CATT~~C~~ATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATTCTGAACAGATGGATTACCTTT
GTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA
TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTAC~~T~~CCATGAGGTATTCTCACATCCGTG~~T~~CCGGCCGGCG
GGGAGCCCCGTT~~C~~ATCGCAGTGGCTACGTGGACGAC~~C~~GCAGTTCGTGCGGTTGACAGCGACGCCG
CGAGCCAGAGGATGGAGGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGA
GACACGGAAAGTGAAGGCCACTCACAGACTACC~~G~~AGTGGAC~~T~~GGGGACCT~~C~~GCGC~~G~~GCCTACA
ACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGTCGACTGGCGC
TTCC~~T~~CCGCGGGTACCAC~~A~~GTACGCC~~T~~ACGACGGCAAGGATTACATGCCCTGAAAGAGGAC~~T~~CGCCT
CTTGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAGAC~~C~~CCAAGCACAAGTGGGAGGCCATGTGGCGGAG
CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCAC~~G~~TGCGTGGAGTGGCTCCGAGATACTGGAGAACGGGAAGGA
GACGCTGCAGGCCACGGACGCC~~C~~AAAAACG~~C~~ATATGACTACCACGCTGTCTGACCATGAAGCCACC
CTGAGGTGCTGGGCC~~T~~GAGCTT~~C~~ACCC~~T~~CGGAGATCACACTGACCTGGCAGC~~G~~GGATGGGAGGA
CCAGACCCAGACACGGAGCTGTGGAGACCAGGCTTGCGGGATGGAACCTTCCAGAACAGTGGCG
CTGTGGTGGTGC~~T~~CTGGACAGGAGCAGAGATA~~C~~ACCTGCCATGTG~~C~~AGCATGAGGTTG~~C~~CCAAGC
CCCTCACCC~~T~~GAGATGGGAGGCAGTGC~~G~~GGTGGCACA~~A~~AAACTCACACATGCCACCGT~~G~~CCCAGCA
CCTGAATT~~C~~AGGGGACCGTCAGTCTCC~~T~~TTCCCCAAAACCCAAGGACAC~~C~~CTCATGATCTCC
GGACCC~~C~~TGAGGT~~C~~ACATGCGTGGTGGAC~~G~~TGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTG~~C~~ATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTAC~~A~~AGCAC
GTACCGTGTGGT~~C~~AGCGT~~C~~CTCACCGT~~C~~CTGCAC~~C~~AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT~~G~~CA
AGGTCT~~C~~AAACAAAGCC~~T~~CC~~C~~AGCC~~A~~ATCGAGAAAACCATCT~~C~~AAAGCCAAAGGGCAGCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCC~~T~~GCC~~C~~CCATCCC~~G~~GGAGGA~~G~~ATGACCAAGAAC~~C~~AGGTCAGC~~T~~GACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCC~~T~~CC~~C~~GTGTGGACTCCGACGGCT~~C~~TTCTT~~C~~ACAGCAAGCTACCGTGG
ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAA~~C~~GTCTT~~C~~ATGCTCC~~C~~GTATGCACGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGTCC~~T~~CTCC~~T~~GTCTCCGGTAAATAGTGA

FIGURA 29B

Secuencia líder de IL2 humana - cursiva

IL2; H16A = **GCA**; F42A = **GC4** - en negrita (con GCA subrayada)

Enlazador (G4S)4 - subrayado único

A0201 Humano; Y84A = **GCC**; A236C - **TGC** - subrayado doble (con GCC y TGC en negrita)

Enlazador AAAGG - subrayado único

Fc de IgG1 humana; L234F = **TTC**; L235E = **GAG**; P331S = **AGC**

N297-**AAC**; AGG a **AGA** (todavía R) y AGC a **TCC** (todavía S) - (en negrita y subrayado, con TTC, GAG, AAC y AGC en cursiva)

Codones de parada (TAGTGA)

FIGURA 30 (SEQ ID NO:41)

1274:

MSRSVALAVLALLSLSGLEAYMLDLQPETTGGGGSGGGGGGGSIQ RTPKIQVYSCHPA
ENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFSKDWSFYLLYYTEFTPTEK
DEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

Secuencia líder de β 2M humana – en cursiva
E7(11-20) en negrita y subrayado
Enlazador (G45)3 - subrayado único
 β 2M humana; R12C - subrayado doble (R12C en negrita)

FIGURA 31 (SEQ ID NO:217)

1274 sin péptido líder

YMLDLQPETTGGGGSGGGGGGGSIQ RTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGER
IEKVEHSDLFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

E7(11-20) en negrita y subrayada (YMLDLQPETT; SEQ ID NO:77)
Enlazador (G45)3 - subrayado único (GGGGSGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 207)
 β 2M humana; R12C - subrayado doble

FIGURA 32 (SEQ ID NO:43)

Secuencia de nucleótidos 1274 que codifica a 1274 con el péptido líder

ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCTACTCTCTCTGGAGGCCTACATGCTCGA
TTTGCAGCCCCAAACGACGGGTGGAGGTGGTTCTGGAGGAGGCGGTCGGGCGGAGGTGGTAGTATC
CAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCATGCCATCCAGCAGAGAAATGGAAGTCAAATTCCCTGAATT
GCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAA
AGTGGAGCATTCAGACTTGCTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATCTCTGTTATTTAACTGAATTCACCCC
CACTGAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGAACCACGTGACTTGTCACAGCCCAAGATGTTAAGTG
GGATCGAGACATGTAGTGA

Secuencia líder de β 2M humana – en cursiva
E7(11-20) - en negrita y subrayado
Enlazador (G45)3 - subrayado único
 β 2M humana; R12C - TGC - subrayado doble (TGC en negrita) 5 codones de parada TAGTGA

FIGURA 33A (SEQ ID NO:44)

Secuencia Fc de IgG1 humana WT:

DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSPGK

FIGURA 33B (SEQ ID NO:45)

Mutante Fc de IgG1 humana: L234F/L235E/P331S (Triple Mutante "TM")

DKTHCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSIETISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSPGK

FIGURA 33C (SEQ ID NO:46)

Mutante Fc de IgG1 humana: N297A

DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSPGK

FIGURA 33D (SEQ ID NO:47)

Mutante Fc de IgG1 humana: L234A /L235A ("LALA")

DKTHCPPCPAPEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSPGK

Residuo numerado de acuerdo con el índice de la UE (numeración de Kabat)

FIGURA 34A (SEQ ID NO:48)

B2M R12C

IQRTPKIQVYSSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFSFKDWSFYLL
YYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

FIGURA 34B (SEQ ID NO:49)

IL-2 (H16A; F42A)

APTSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKP
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS
TLT

FIGURA 34C (SEQ ID NO:50)

Cadena de MHC-H clase I A0201 (Y84A; A236C)

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAFWIEQEGPEYWDGETR
KVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYLALKEDL
RSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVELRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLROWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGT
FQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE

FIGURA 35

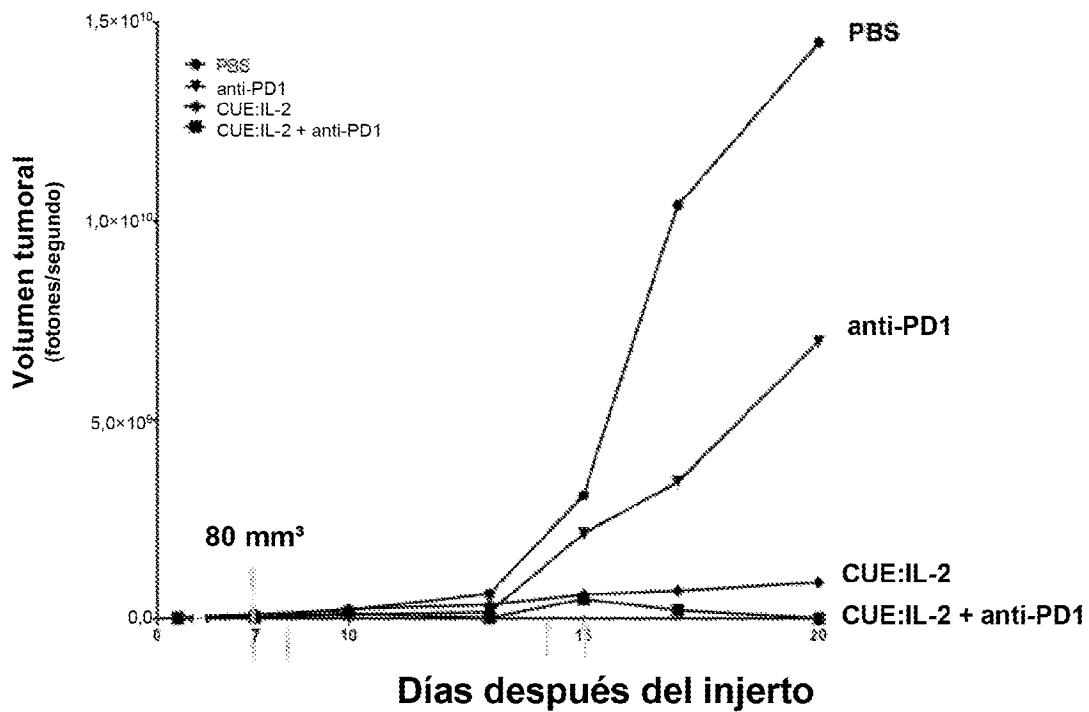


FIGURA 36A

4-1-BBL

Homo sapiens

GenBank NP_003802

Dominio citoplasmático = 1-25

Dominio transmembrana = 26-48

Ectodominio = 49-254

Dominio de homología TNF = 80-254, 81-254 u 80-246

1	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPPWA	LVAGILLILLI LAAACAVFLA	CPWAVSGARA
61	SPGSSAASSPRL REGPEILSPDD PAGLUDIIRQG	MTAQIVAQNV LIIDGPIISWY	SDPGLAGVSI
121	TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR	RVVAGEEGGS VSLALIHLQPL	RSAGAAALA
181	LIVDLPASS EARNSAEFGEQ	GRILHLSAGQ RLGVHLHTEA	RARHAWQLTQ
241	TPETITAGLPS ERSE	(SEQ ID NO: 99)	GATVVLGLERV

FIGURA 36B
K127

81 PAGLIDIROG MFAOLVAQNV LIIDGPLISWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYXEDT KELVVAKAGV YYVFFQIELR RVVAGEGSGS VSLALHQLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:100)

FIGURA 36C
K127

81 PAGLIDIROG MFAOLVAQNV LIIDGPLISWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYAEDT KELVVAKAGV YYVFFQIELR RVVAGEGSGS VSLALHQLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:101)

FIGURA 36D
Q227

81 PAGLIDIRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFCFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 102)

FIGURA 36E
M91

95 PAGLIDIRQG XFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
81 PAGLIDIRQG XFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFCFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 103)

FIGURA 36F
F92

81 PAGLIDIRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFCFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 104)

FIGURA 36G
Q94

81 PAGLIDLRQG MFAZLVAQNV LLIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 105)

FIGURA 36H
L95

81 PAGLIDLRQG MFAQ~~Z~~XVAQNV LLIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 106)

FIGURA 36I
V96

81 PAGLIDLRQG MFAQ~~LX~~AQNV LLIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 107)

FIGURA 36J
Q98

81 PAGLLDLRQG MFAQLVAXN LLIIDGPLISWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHQLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:108)

FIGURA 36K
N99

81 PAGLLDLRQG MFAQLVQAX LLIIDGPLISWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHQLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:109)

FIGURA 36L
V100

81 PAGLLDLRQG MFAQLVQAN LLIIDGPLISWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHQLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:110)

FIGURA 36M
L101

91 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LIXDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGISYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQELR RVVAGEGSGS VSLALHQLP RLAAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGQ GRILLHSAGQ RLGVHLNTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLTRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 111)

FIGURA 36N
L102

98 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LIXDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGISYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQELR RVVAGEGSGS VSLALHQLP RLAAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGQ GRILLHSAGQ RLGVHLNTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLTRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 112)

FIGURA 36O
L103

91 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LIXDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGISYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQELR RVVAGEGSGS VSLALHQLP RLAAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGQ GRILLHSAGQ RLGVHLNTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLTRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 113)

FIGURA 36P
D104

81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNV LI₁I₂X₃PLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSGS VSI₁A₂LH₃LQPL RSAAGAAAI₄
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:114)

FIGURA 36Q
GIOS

99 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNV LI₁I₂D₃X₄PLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSGS VSI₁A₂LH₃LQPL RSAAGAAAI₄
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:115)

FIGURA 36R
p106

99 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNV LI₁I₂D₃X₄PLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSGS VSI₁A₂LH₃LQPL RSAAGAAAI₄
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:116)

FIGURA 36S
L107

81 PAGLDLIRQG MEAQQLVAQNY LIIDGPXSY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVWAKAGV YVVEFEQELRL RVVAGEGSQS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
181 LTVVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQLTQ GATVILGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 117)

FIGURA 36T
S108

81 PAGLDLIRQG MEAQQLVAQNY LIIDGPLXSY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVWAKAGV YVVEFEQELRL RVVAGEGSQS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
181 LTVVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQLTQ GATVILGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 118)

FIGURA 36U
W109

81 PAGLDLIRQG MEAQQLVAQNY LIIDGPLXSY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVWAKAGV YVVEFEQELRL RVVAGEGSQS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
181 LTVVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQLTQ GATVILGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 119)

FIGURA 36V
Y110

81 PAGLIDDERQS MEAQQLVAQNV LIIDGPISWX SDPGLAGVSL
121 YGGLSYKEDT KELVYAKAGV YYVFFOLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 IITVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHSAGQ RLGVLHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS ERSE (SEQ ID NO: 120)

FIGURA 36W
S111

81 PAGLIDDERQS MEAQQLVAQNV LIIDGPISWX XDPGLAGVSL
121 YGGLSYKEDT KELVYAKAGV YYVFFOLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 IITVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHSAGQ RLGVLHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS ERSE (SEQ ID NO: 121)

FIGURA 36X
D112

81 PAGLIDDERQS MEAQQLVAQNV LIIDGPISWY SXPGLAGVSL
121 YGGLSYKEDT KELVYAKAGV YYVFFOLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 IITVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHSAGQ RLGVLHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS ERSE (SEQ ID NO: 122)

FIGURA 36Y

P113
 61
 121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVEFQLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPI R~~S~~AAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAEFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
 241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO:123)

FIGURA 36Z

G114
 81
 121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVEFQLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPI R~~S~~AAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAEFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
 241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO:124)

FIGURA 36AA

L115
 81
 121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVEFQLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPI R~~S~~AAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAEFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
 241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO:125)

FIGURA 36BB

G117
 81
 121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVEFQLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPI R~~S~~AAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAEFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
 241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO:126)

FIGURA 36CC

V118
81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LLIDGPLSWY SDPGLAGGSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVFQOLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLSGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:127)

FIGURA 36DD

S119
81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LLIDGPLSWY SDPGLAGVXL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVFQOLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLSGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:128)

FIGURA 36EE

L120
81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LLIDGPLSWY SDPGLAGVSX
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YVVFQOLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLSGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:129)

FIGURA 36FF

T121
81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNY LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 XGGLSYKEDT KELVVAKAGV YVVFQOLEIR RVVAGEGSGS VSLAHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVLSGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:130)

FIGURA 36GG

G122	81	EAGLIDLRQG MEAQLVAQNY LIITDPLSWY SDPELAGVSL
	121	TXGLSYKEDT KELVVKAGVY YVVFQOLELR RVVAGCSCGS VSLAIHLQPL RSAAGAAALA
	181	LTVOLPPASS EARNSAFEGEQ GRILLHSAGQ RLGVILHTEA RAHKAWQLTQ GATVIGLERV
	241	TPEIAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 131)

FIGURA 36HH

G123
81 PAGLIDIROQ MEAQIWAQN VLIIDGPLISWY SDPGLAGVSL
121 TEXILSYKELT KELVVAKASV YVVEFOLELR RVVAGEGSGS VSLAHHIQPL RSAAGGAALA
181 LTVDOLEPASS EARNSAEAEQ GRILLHSAGQ RLGVHLETEA RARKHAWQLTO GATVLCGLERY
241 TPELIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 132)

FIGURA 3611

L124
81 PAGLDLROQ MFAQLVAQNY LLIDGELSRY SDPGLAGVSL
121 TGGZSYKELI KELIVVAKAGV YYYFQELLR RYVAGEGSGS VSLAHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDELPASS EARNSAFGEQ GRILHLSAGO RLGVHLTEA RAKHAWQLTQ GATVGLGFLRV
241 TPBIPAGLES PRSE (SEQ ID NO: 133)

FIGURA 36JJ

\$125
 81 PAGLILDRQG MFAQLVAQMV LLIDGPISWY SDPGLAGVSL
 121 TGGL~~L~~XKEDF KELVVKAKGV YIVFEQELR RVVAGEGSSS VSIALLHQPL RSAAGRANLA
 161 LPVDIIPASS EARNSAFGFQ GRILHLSAGO RUGVHLHTEA RARHAWOLTO GATVNLGLTRY
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 134)

FIGURA 36KK

Y126
 81 PAGLIDRQG MEAQLVAGMV LLINGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 KELVVAKAGV YIVVFQLELR RVVAGGESGS VSIALHLQPL RSAAGARALA
 161 LTVDLIPASS EARNSAFGEQ GRLLHLSAGO RIGVHILTEA RARIHAQLTQ GATVILGLFRV
 241 TPEPIAGLPS PRSE (SEQ ID NO:135)

FIGURA 361

EIGIIRA 36MM

D129
81 PAGLILILRGCG MPAQULVACQNV LLIDGELSWM SDPGLAGVSL
121 TGGILSYKEXT KELVVAKAGV YYVEFQELR RVVAGEGSS VSLALHQLP RSAAGAAALA
181 HVDLIPASS EARNSAFGQ GRILLHSACQ RLGVHLHTER RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
241 TEEIPAGEFS PRSE (SEQ ID NO: 137)

FIGURA 36NN

T130
81 PAGLIDLERQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEHQ GRLLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 138)

FIGURA 36OO

K131
81 PAGLIDLERQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEHQ GRLLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 139)

FIGURA 36PP

E132
81 PAGLIDLERQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEHQ GRLLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 140)

FIGURA 36QQ

F144
81 PAGLIDLERQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFEHQ GRLLHLSAGQ RLGVHLTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 141)

FIGURA 36RR

F145 81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGELSYKEDT KELVVAKAGV YYVF~~X~~QELR RVVAGEGSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
 181 LTVVDLPPASS EARNSAE~~G~~Q GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:142)

FIGURA 36SS

Q146 81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGELSYKEDT KELVVAKAGV YYVF~~X~~QELR RVVAGEGSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
 181 LTVVDLPPASS EARNSAE~~G~~Q GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:143)

FIGURA 36TT

L147 81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGELSYKEDT KELVVAKAGV YYVF~~Q~~XELR RVVAGEGSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
 181 LTVVDLPPASS EARNSAE~~G~~Q GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:144)

FIGURA 36UU

E148 81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGELSYKEDT KELVVAKAGV YYVF~~Q~~XLR RVVAGEGSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
 181 LTVVDLPPASS EARNSAE~~G~~Q GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:145)

FIGURA 36WW

L149

81 PAGLIDLROG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVAKAGV YYVFFQLER RVVAGEGSGS VSLALHQPL RSAAGAAAZLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAQ RLGVLHTEA RARHAWQLQ GATVVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 146)

FIGURA 36WW

R150

81 PAGLIDLROG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVAKAGV YYVFFQLER XVVAGEGSGS VSLALHQPL RSAAGAAAZLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAQ RLGVLHTEA RARHAWQLQ GATVVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 147)

FIGURA 36XX

R151

81 PAGLIDLROG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVAKAGV YYVFFQLER XVVAGEGSGS VSLALHQPL RSAAGAAAZLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAQ RLGVLHTEA RARHAWQLQ GATVVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 148)

FIGURA 36YY

V152

81 PAGLIDLROG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVAKAGV YYVFFQLER RVVAGEGSGS VSLALHQPL RSAAGAAAZLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAQ RLGVLHTEA RARHAWQLQ GATVVLGLERV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 149)

FIGURA 36ZZ

V153

81	PAGLILRQG MEAQLVAQNV LIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121	KELVVAKAGV YYVEFQLELR <u>XVXAGEGSGS</u> VSLALHIQPL RSAAGAAALA
181	LTVDLPEASS EARNSAFGFQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241	TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:150)

**FIGURA 36AAA
G155**

81	PAGLILRQG MEAQLVAQNV LIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121	KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAX <u>XEGSGS</u> VSLALHIQPL RSAAGAAALA
181	LTVDLPEASS EARNSAFGFQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241	TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:151)

**FIGURA 36BBB
E156**

81	PAGLILRQG MEAQLVAQNV LIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121	KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAG <u>XGSGS</u> VSLALHIQPL RSAAGAAALA
181	LTVDLPEASS EARNSAFGFQ GRILLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241	TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:152)

FIGURA 36CCCC
G157

81 PAGLLDIRQG MFAQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQLELR RVVAGEXSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **153**)

FIGURA 36DDDD
S158

81 PAGLLDIRQG MFAQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGXGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **154**)

FIGURA 36EEEE
D184

81 PAGLLDIRQG MFAQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
181 LTVXLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARRHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **155**)

FIGURA 36FFF
L185

81 PAGLILDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDSPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSQ VSIAALHQLP RSAAGAAALA
181 LTVVD~~X~~PASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RIGVHLHTEA RARHAWQITQ GAVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **156**)

FIGURA 36GGG
P186

81 PAGLILDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDSPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSQ VSIAALHQLP RSAAGAAALA
181 LTVVD~~X~~PASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RIGVHLHTEA RARHAWQITQ GAVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **157**)

FIGURA 36HHH
P187

81 PAGLILDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDSPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSQ VSIAALHQLP RSAAGAAALA
181 LTVVD~~X~~PASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RIGVHLHTEA RARHAWQITQ GAVVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **158**)

FIGURA 36III
S189

81 PAGLIDIRQG MFAQLVAQNV LLIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPAX EARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO: 159)

FIGURA 36JJJ
S190

81 PAGLIDIRQG MFAQLVAQNV LLIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPSX EARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO: 160)

FIGURA 36KKK
E191

81 PAGLIDIRQG MFAQLVAQNV LLIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPAS XARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO: 161)

FIGURA 36LLL
R193

81 PAGLIDIRQG MFAQLVAQNV LLIIDPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPAS EARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLES PRSE (SEQ ID NO: 162)

FIGURA 36MMM

N194

81 PAGLDIRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQIELR RVVAGEGSSS VSLAHLHQPL RSAAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARXSAGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVGLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **163**)

FIGURA 36NNN

S195

81 PAGLDIRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQIELR RVVAGEGSSS VSLAHLHQPL RSAAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVGLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **164**)

FIGURA 36OOO

F197

81 PAGLDIRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQIELR RVVAGEGSSS VSLAHLHQPL RSAAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVGLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **165**)

FIGURA 36PPP

Q210

81 PAGLDIRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
 121 TGGLSYKEDT KELVVKAGV YYVFFQIELR RVVAGEGSSS VSLAHLHQPL RSAAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAGFQ GRLLHLSAGX RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVGLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **166**)

FIGURA 36QQQ
8211

81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YIVFFQLELR RVVAGESSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
181 LTVIDLPPASS EARNSAFEGQ GRILLHSAGQ XLGVLHLTEA RARKHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:167)

FIGURA 36RRR
L212

81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YIVFFQLELR RVVAGESSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
181 LTVIDLPPASS EARNSAFEGQ GRILLHSAGQ RXGVHLHTEA RARKHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLFS PRSE (SEQ ID NO: 168)

FIGURA 36SSS
G213

81 PAGLIDLRQG MFAQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TCGLSYKEDT KELVVAKAGV YIVFFQLELR RVVAGESSGS VSLALHLOPL RSAAGAAALA
181 LTVIDLPPASS EARNSAFEGQ GRILLHSAGQ RLXVHLHTEA RARKHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:169)

FIGURA 36TTT
V214

81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLEIR RVVAGEGSGS VSI~~LAH~~LQPL RSAAGAAALA
181 LTVVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSA**SG**Q RLG**V**XHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGFLRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 170)

FIGURA 36UUU
I215

81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLEIR RVVAGEGSGS VSI~~LAH~~LQPL RSAAGAAALA
181 LTVVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSA**SG**Q RLG**V**XHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGFLRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 171)

FIGURA 36VVV
L216

81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLISYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLEIR RVVAGEGSGS VSI~~LAH~~LQPL RSAAGAAALA
181 LTVVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILLHLSA**SG**Q RLG**V**XHTEA RARHAWQLTQ GATVVLGFLRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 172)

FIGURA 36WWW
H217

81 PAGLIDLROQ MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILHLSAGQ RIGVHLXEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:173)

FIGURA 36XXX
T218

81 PAGLIDLROQ MFAQLVAQNV LLIDGELSRY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILHLSAGQ RIGVHLXEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:174)

FIGURA 36YYY
E219

81 PAGLIDLROQ MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALLA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRILHLSAGQ RIGVHLHXA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:175)

FIGURA 36ZZZ
R221

81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNY LLIDGPLSMY SDFGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSSS VSLALMQLP RSPAGAAALA
161 LTVIDLPPASS EARNSAFEQ GRILLHSAGQ RIGSVHILTEA RAXHAWQLTQ GATVILGLTRV
241 TPEIIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 176)

FIGURA 36AAAA
R223

81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNY LLIDGPLSMY SDFGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSSS VSLALMQLP RSPAGAAALA
161 LTVIDLPPASS EARNSAFEQ GRILLHSAGQ RIGSVHILTEA RAXHAWQLTQ GATVILGLTRV
241 TPEIIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 177)

FIGURA 36BBBB
R224

81 PAGLIDLRQG MEAQQLVAQNY LLIDGPLSMY SDFGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVEFQLELR RVVAGEGSSS VSLALMQLP RSPAGAAALA
161 LTVIDLPPASS EARNSAFEQ GRILLHSAGQ RIGSVHILTEA RAXHAWQLTQ GATVILGLTRV
241 TPEIIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 178)

FIGURA 36CCCC
W226

81 PAGLLDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDEGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 IIVVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RIGVHLHTEA RARKHAXQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 179)

FIGURA 36DDDD
L228

81 PAGLLDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDEGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 IIVVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RIGVHLHTEA RARKHAWQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 180)

FIGURA 36EEEE
T229

81 PAGLLDLRQG MEAQQLVAQNV LIIDGPLSWY SDEGLAGVSL
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFEQLELR RVVAGEGSQS VSLALHILQPL RSAAGAAALA
181 IIVVDLPPASS EARNSAFGEQ GRILLHLSAGQ RIGVHLHTEA RARKHAWQ GATVLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: 181)

FIGURA 36FFFF
Q230

81 PAGLILDLRQG MFAQLVAQNY LLIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVWAKAGV YYVFQLELR RVVAGEGSGS VSLIAHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLBLSAGQ RLSVHLHTEA RARHAWQITXATIVLGLTRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:182)

FIGURA 36GGGG
G231

81 PAGLILDLRQG MFAQLVAQNY LLIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVWAKAGV YYVFQLELR RVVAGEGSGS VSLIAHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLBLSAGQ RLSVHLHTEA RARHAWQITOATIVLGLTRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:183)

FIGURA 36HHHH
I233

81 PAGLILDLRQG MFAQLVAQNY LLIIDGPLSWY SDPGLAGVSL
121 TGGISYKEDT KELVWAKAGV YYVFQLELR RVVAGEGSGS VSLIAHILQPL RSAAGAAALA
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLBLSAGQ RLSVHLHTEA RARHAWQITOGAXVLAGLTRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:184)

FIGURA 36||||

V234

81 PAGLIDLRQG MEAQLVQAQW LLIDGEPSWY SDPGLAGVSL
121 TCGELSSYKEDT KEIUVVAKAGV XYYVFOLEIR RVVAGEGSSS VSIAHHLQPL RSHAGAAALA
181 LTVVDLLEPASS KARNSAFGQQ GRILLHSAGQ RLGVHHLTEA RARHAKQLTQ GATXLLGLFRV
241 TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO: **185**)

FIGURA 37

Humanus
4-1BB

1 magnscyniva tllivlnfer tzsldapcsn spagtfedon rnijsespccp nssseggir
61 tcdicrcqkgs vfrtrkecss tspaecdctp gfhelgagcs mceqdcikqqa eltkkgckdo
121 cftgtfnadqkx gicrpwntcs lbgkxviving tkerdvvccp spadispgas svtpapare
181 pgbspqjif flaltstall filffitlnf svvkirkkl lyifkqpnr pvttqeedig
241 oscrippeee ggcel (SEQ ID NO: 186)

FIGURA 38A

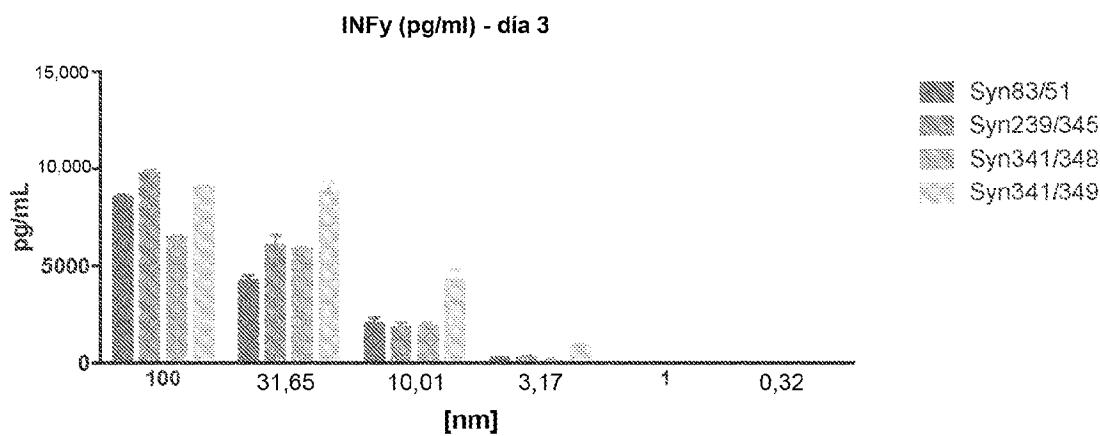


FIGURA 38B

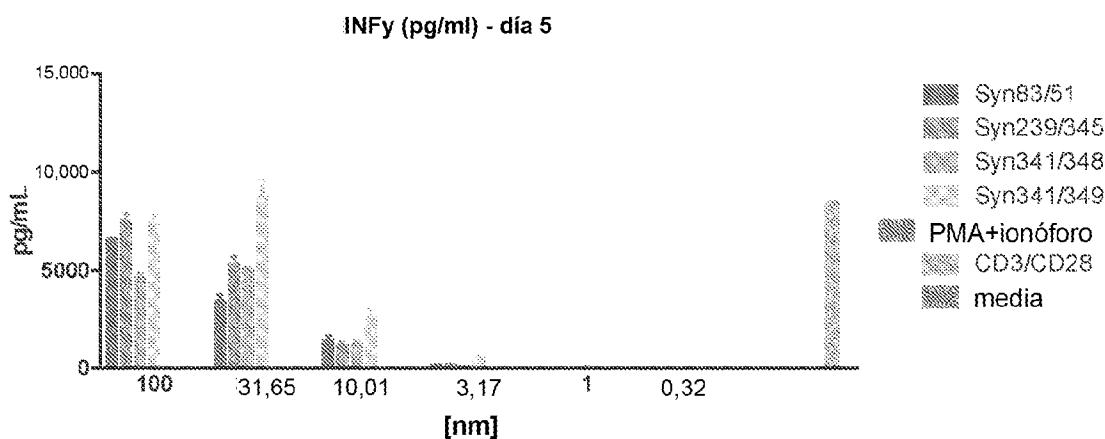


FIGURA 39A

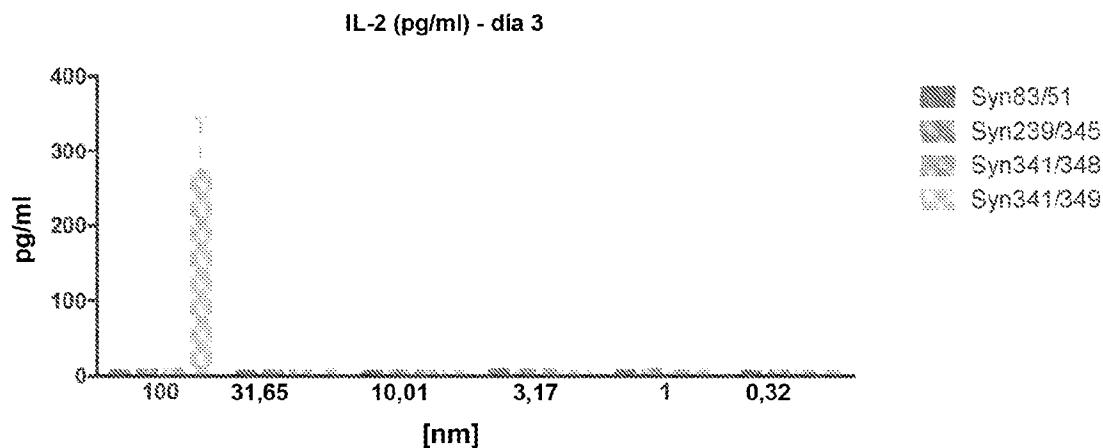


FIGURA 39B

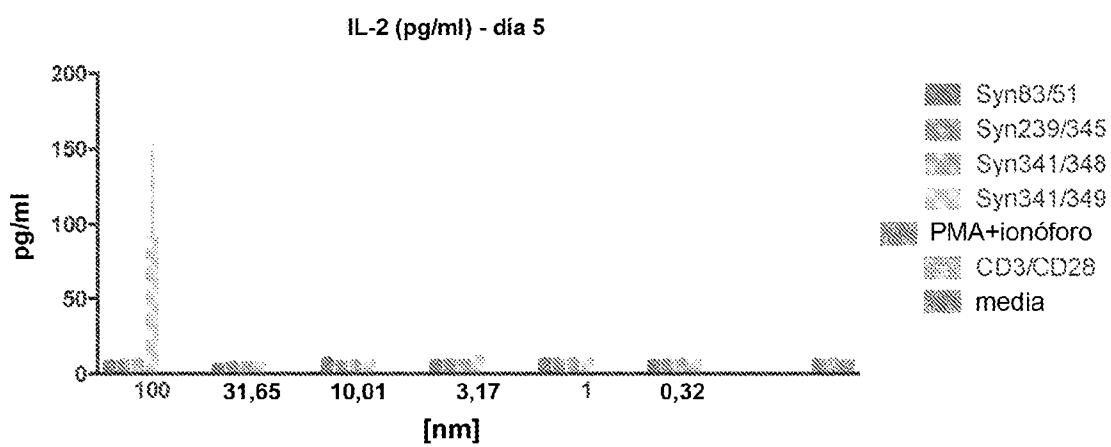


FIGURA 40A

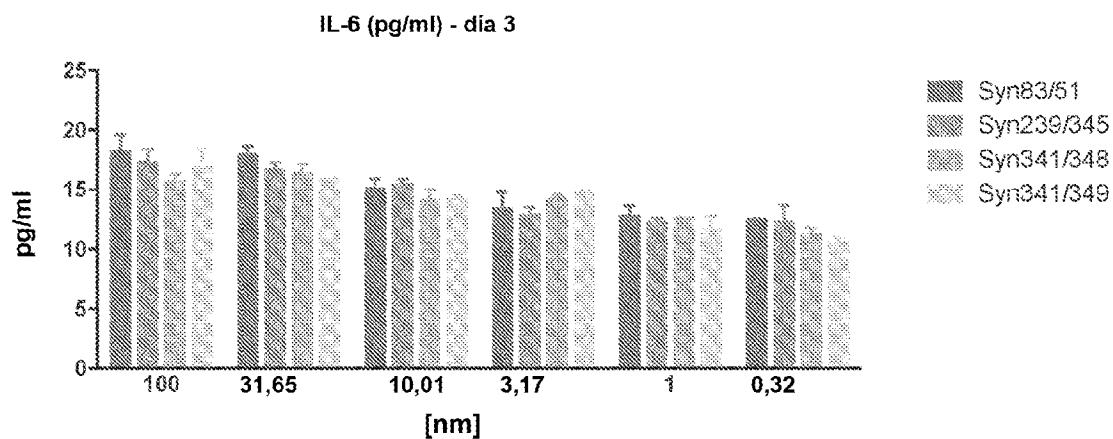


FIGURA 40B

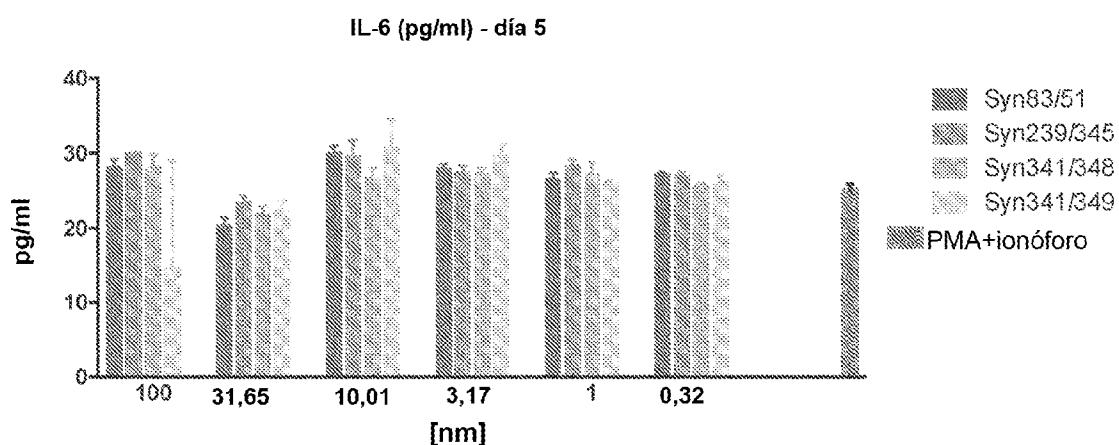


FIGURA 41A

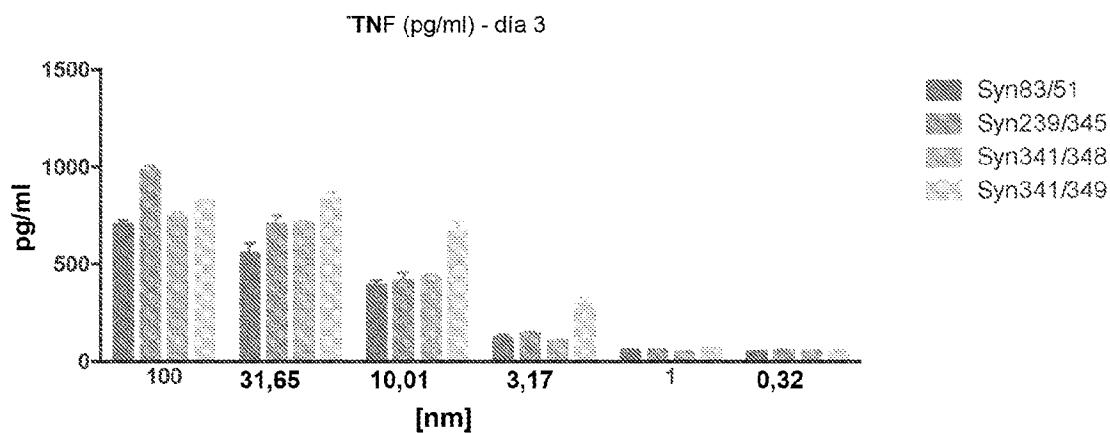


FIGURA 41B

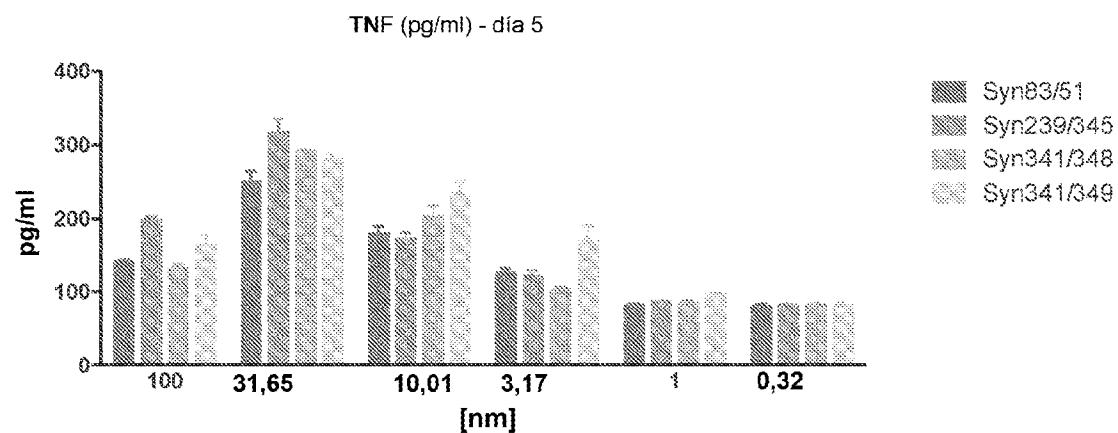


FIGURA 42A

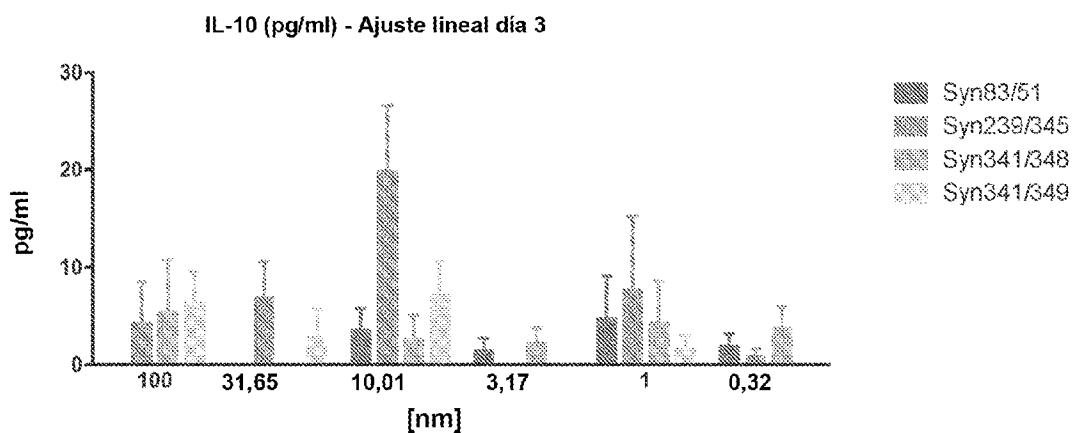


FIGURA 42B

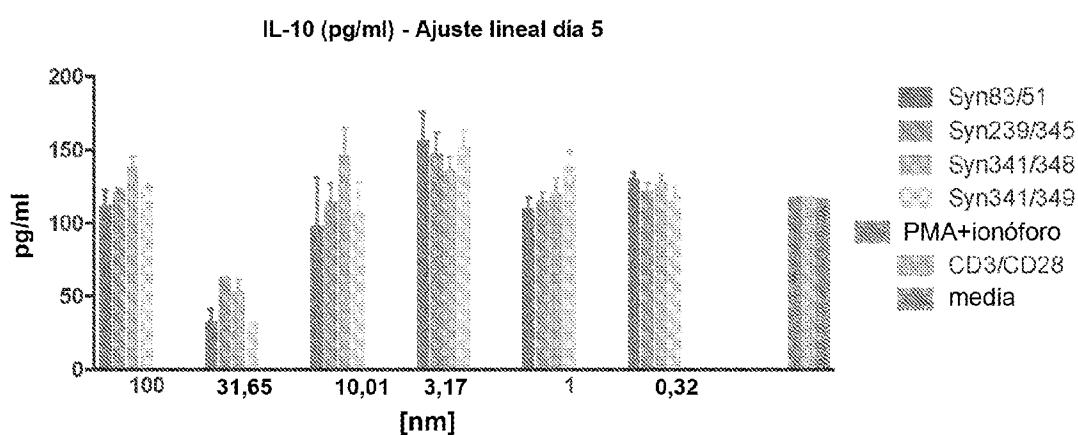


FIGURA 43A

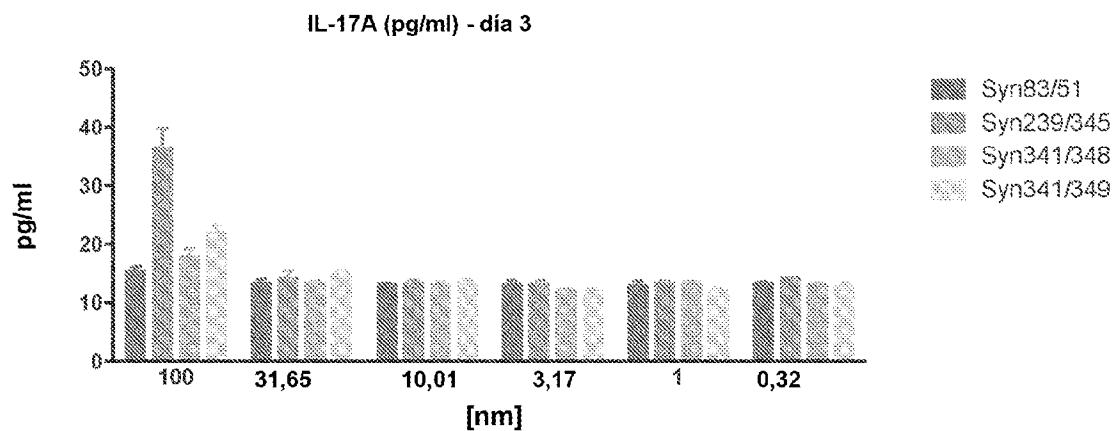


FIGURA 43B

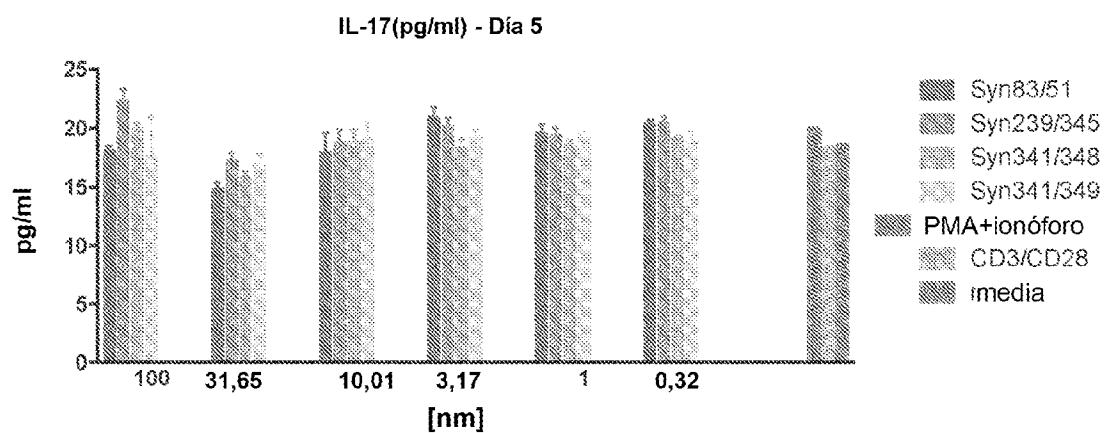


FIGURA 44A

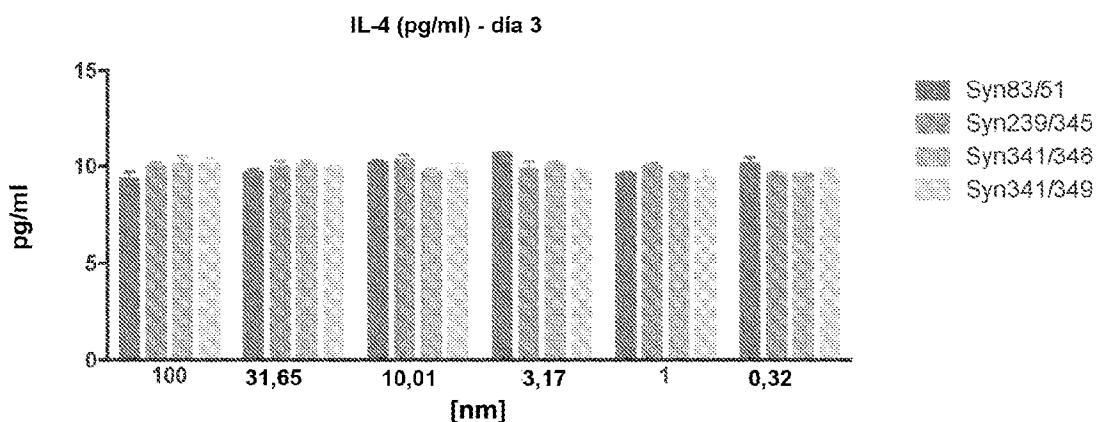


FIGURA 44B

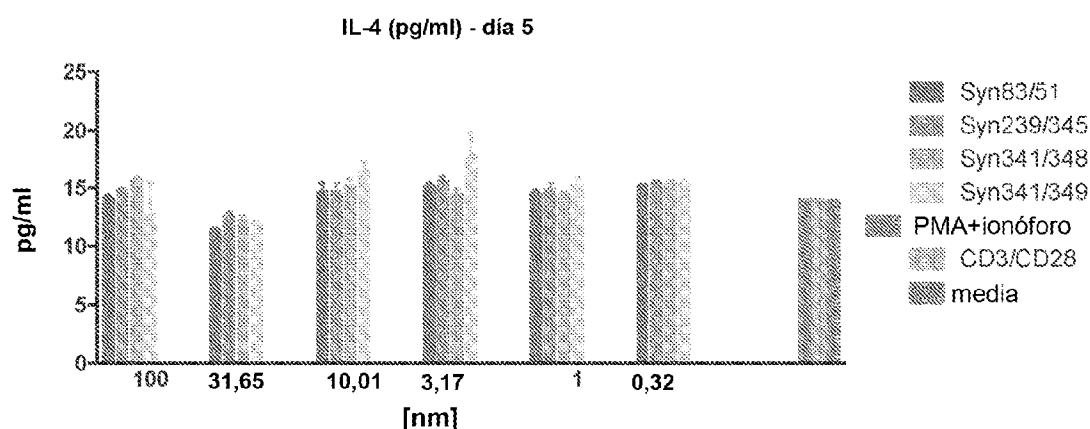


FIGURA 45

% de células vivas que han proliferado 2 generaciones o más

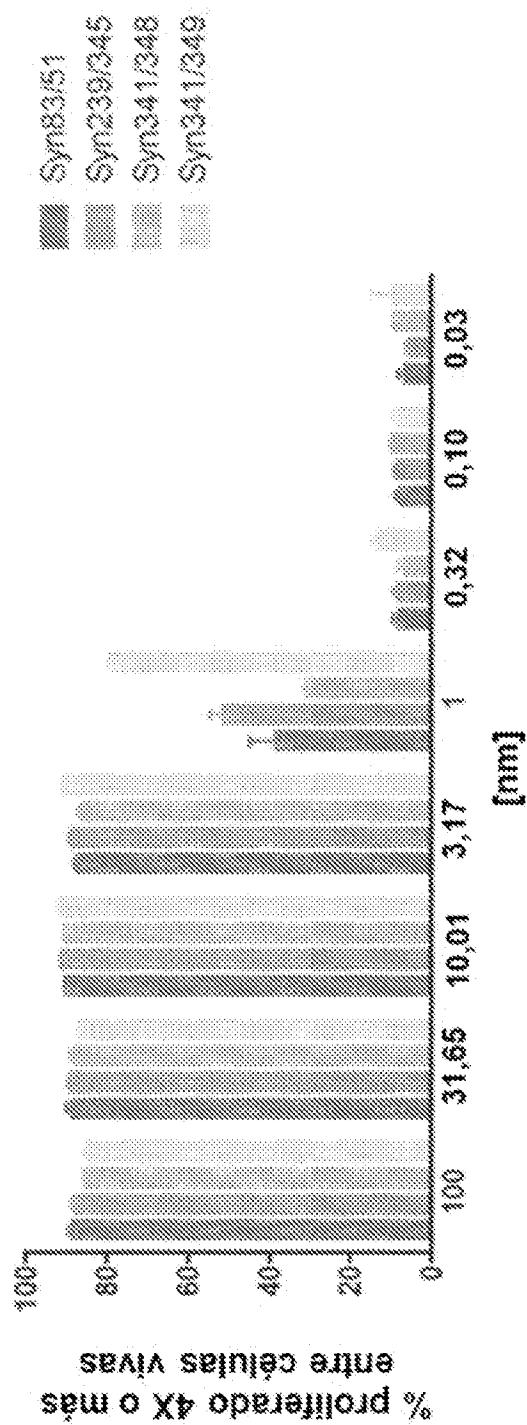


FIGURA 46

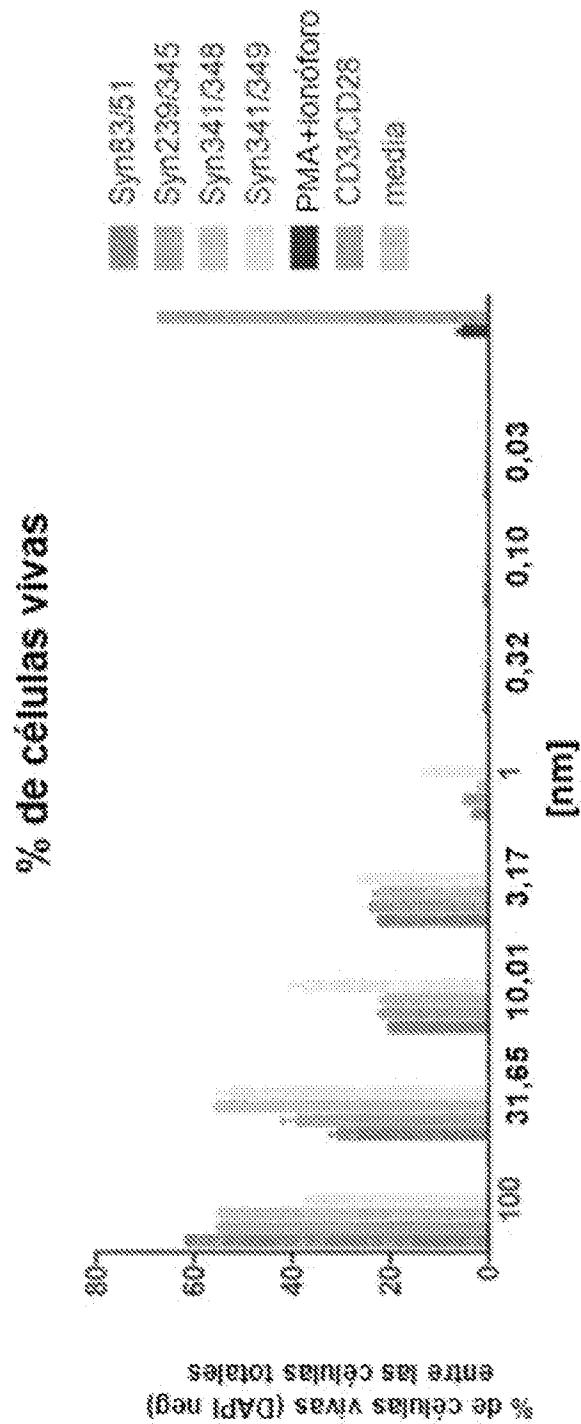


FIGURA 47

Variante de 4-1BBL	Nivel de expresión mg/l	Nivel de expresión mg/l	Cambio sobre el tipo salvaje
M91A	105,9	115,9	14
F92A	48,9	41,6	5,8
Q94A	13,8	23,1	2,3
L95A	81,8	63,3	9,2
V96A	16,2	24,4	2,6
Q98A	43,0	43,0	5,5
N99A	35,3	53,3	5,6
V100A	37,6	42,6	5,1
L101A	137,8	203,2	21,7
L102A	148,0	184,4	21,2
I103A	48,0	68,0	7,4
D104A	70,5	65,1	3,9
G105A	23,8	37,6	2,6
P106A	81,2	66,0	9,4
L107A	13,8	13,4	1,7
S108A	66,2	72,1	8,8
W109A	15,6	30,8	2,9
Y110A	107,0	110,1	13,8
S111A	104,0	109,0	13,6
D112A	28,0	32,1	3,8
P113A	60,1	60,4	7,7
G114A	94,8	81,7	3,9
L115A	23,0	26,4	3,1
G117A	4,4	12,5	
V118A	4,2	5,3	
S119A	4,6	5,6	
L120A	4,6	4,6	
T121A	4,9	6,3	
G122A	9,8	9,5	
G123A	2,5	10,4	
L124A	3,1	8,5	
S125A	8,9	8,3	
Y126A	2,3	0,6	
E128A	6,1	14,6	
D129A	2,2	0,0	

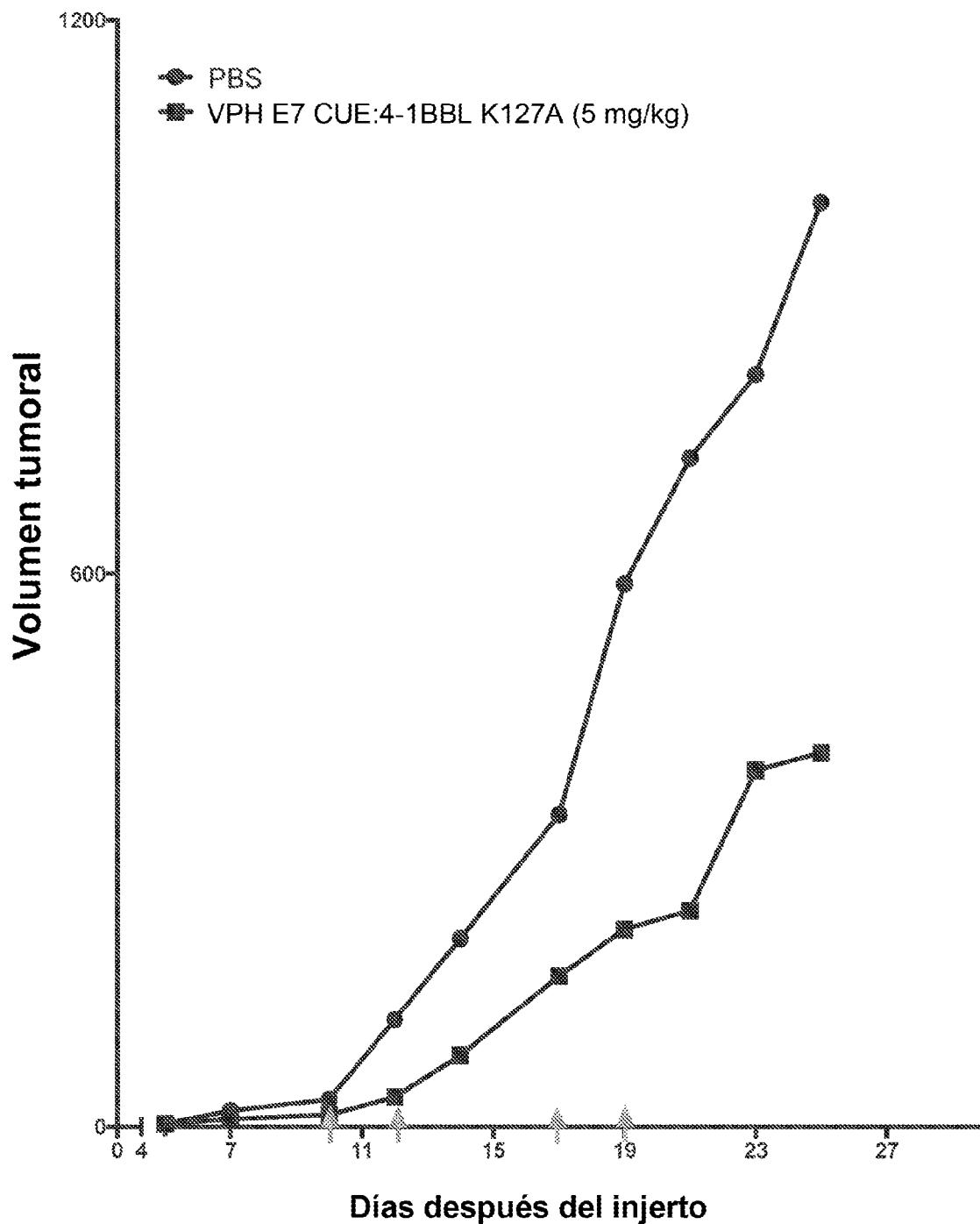
FIGURA 47 (cont.)

Variante de 4-BBL	Nivel de expresión mg/l	Nivel de expresión mg/l	Cambio sobre el tipo salvaje
T130A	1,9	2,6	
K131A	7,0	15,3	
E132A	2,3	6,8	
F144A	1,5	0,0	
F145A	8,2	6,3	
Q146A	5,7	10,5	
L147A	10,3	16,8	
E148A	5,7	4,4	
L149A	9,9	12,9	
R150A	10,3	4,7	
R151A	1,8	0,0	
V152A	2,9	6,7	
V153A	3,7	7,9	
G155A	6,9	13,1	
E156A	4,3	4,0	
G157A	12,3	18,7	
S158A	6,7	6,3	
D184A	3,6	5,0	
L185A	2,2	0,0	
P186A	4,3	2,2	
P187A	2,9	0,0	
S189A	3,8	6,1	
S190A	2,4	3,1	
E191A	1,8	4,1	
R193A	6,6	7,5	
N194A	4,3	0,1	
S195A	3,2	1,6	
F197A	3,1	6,5	
Q210A	5,1	3,9	
R211A	1,6	3,5	
L212A	2,0	9,8	
G213A	5,0	2,9	
V214A	2,7	7,5	
H215A	3,3	2,4	
L216A	3,4	10,2	

FIGURA 47 (cont.)

Variante de 4-tBBL	Nivel de expresión mg/l	Nivel de expresión mg/l	Cambio sobre el tipo salvaje
H217A	8,6	3,2	
T218A	6,6	9,9	
E219A	2,8	5,2	
R221A	3,3	8,7	
R223A	6,2	9,7	
H224A	4,1	6,0	
W226A	1,9	0,0	
L228A	3,1	0,0	
T229A	6,0	7,8	
Q230A	2,7	4,7	
G231A	1,9	2,4	
T233A	1,8	0,0	
V234A	1,9	0,0	
peso	3,8	11,9	

FIGURA 48



Rox, CUE-4128L + anti-PG1

Rox, CUE-4128R.

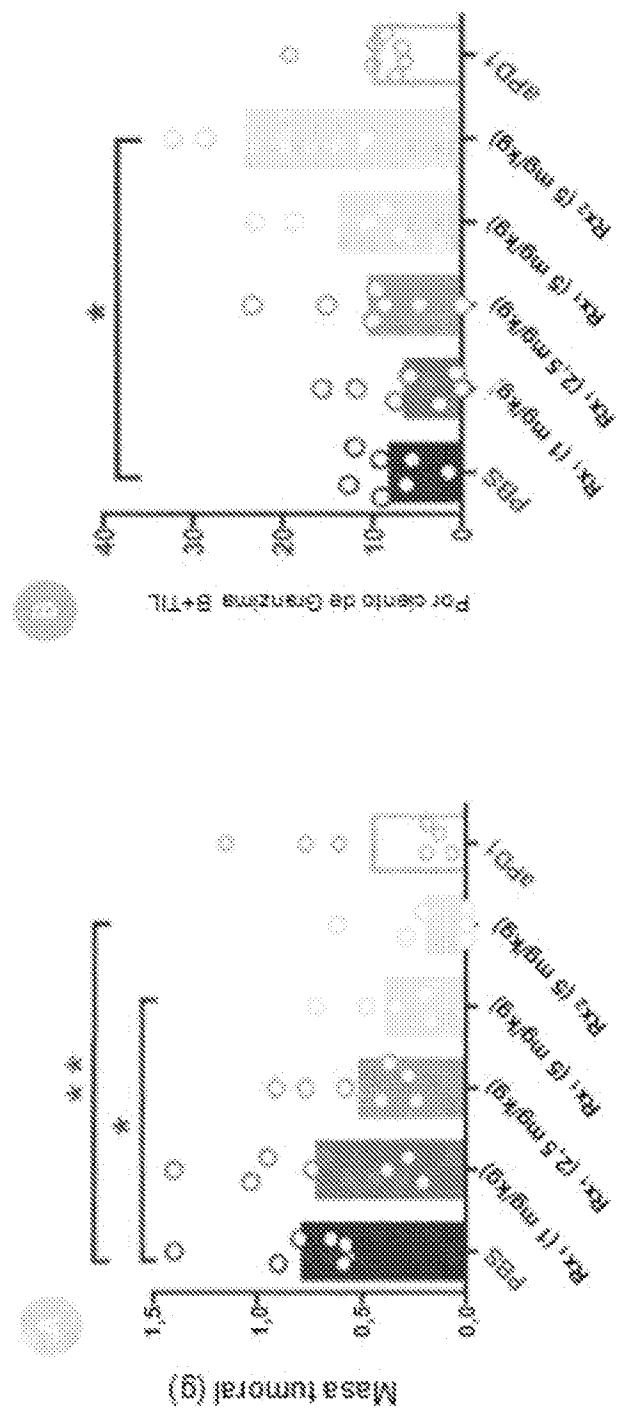


FIGURA 48

FIGURA 50A

PD-L1

Mus musculus

NP_068693

Aminoácidos 19-290

1 mriifagilift acchilirraft itapkdllyvv eygsnvtmec rfpvereldl laivyyweke
 61 deqvicffvag eedlkpghsn frgraslpkd qllkgraalq itdvkliqqdag vycclisyygg
 121 adykrilky napynkingr isvdpatseh elicqaegyp eaevintnsd hepvsgkrsv
 181 ttsrtegmii nvtssirvna tandvfyctf wrsqppqgnht aeliipelpa thppqrntiw
 241 vilgsillifl ivystvlfli rkqvrmlde kgvedtssk nnndtqfeet

(SEQ ID NO:187)

FIGURA 50B

PD-L1

Homo sapiens

NP_054852

Aminoácidos 19-290

1 mriifavffim tywhlinaff vtvpkdllyvv eygsnntiec kfpvekqldl aalivyywene
 61 dkniiqffvhg eedlkvghss yrgrarllkd qlslgnaalq itdvkliqqdag vyrnisiyygg
 121 adykrilky napynkingr liivvdptse helteqaaegy pkaeviwtss dhqvlsgket
 181 ttnskreekl fnvtstirin ttneifvct frridpeenh taelvipelp lahppnerth
 241 lvilgailic lgvaltfifr irkgrmndvk kgigqdtnsk kqscthleet

(SEQ ID NO:188)

FIGURA 51

Ectodominio de CD80 (B7-1)

vihvtk evkevatlsc ghnvsveela
qtriywqkek kavltmnsqd minippeyknr tifdtnils ivillalrpsd egyptevvlik
yekdaffreh laettsvka dfttssisdf eiptsnirri icsstsggfpf phiswlenge
einaintvs qdpetelyav sskldffmtt nhsfncliky ghlrvngtfn wnttkgehfp
dn (SEQ ID NO:189)

FIGURA 52

Homo sapiens

IQOS-L

GenBank NP_056074

Aminoácidos 19-302

1 mrlgspglif llfsslradt gekevramv sdvelscacp egsrfdlndv yywyqtsesk
61 tvvtiyhipn ssienvdsry rnralnspag mlrgdfslrl fnvtpqdeqk fhclvlsgsl
121 qfqevisvey tlhvaanfsv pvvssaphps qdeltftcts ingyprpny winktdnsii
181 dqalqndtvf lmrglydvv svirriartps vnioccienv llgnitvgs qtgnndigerd
241 kitenpvstq eknaatwsil avicllvvva vaigwcrdr clghsyagaw avspetelg
301 hv
(SEQ ID NO:190)

FIGURA 53

Homo sapiens

GenBank NP_003317

OX4L

1 mervqpleen vgnaaarprie zklllvavv iqglgllicf tyichlfssal qvshypriq
61 sikwqffeyk kekgfflitsq kedeimkyqn usviinedgf ylisiikyfs qeynislhyc
121 kdeepifqik kyrsvnslnv asitykdkyv invttnts1 ddfhvnggel iihqmpgef
181 cv1
(SEQ ID NO:191)

FIGURA 54

Homo sapiens

GenBank NP_079515

PD-L2

Aminoácidos 20-273

1 mifillimisi elighgiaal ftvtvpkely iiehgsvntl echfdtgshv nlgaitasig
61 kvndtsphr eratlleeql pigkasfhip qvqvrdeggq qciiliygvaw dykytlkvk
121 asyrkintii lkypetdeve itcogatgypq aevswpnvs vantsbsxtp egiyqvtssv.
181 rikpppgnq scvfwnthvr elitasidiq sgnepnptpt wlkifipc liafifiatv
241 iajirkqicqk lysskdtkr pvttkrevn sai.

(SEQ ID NO:192)

FIGURA 55

Homo sapiens

GenBank NP_787058

CD86 (B7-2)

Aminoácidos 31-329

1 incipgetmagls ni fymaflii sqaapikiga yfnetadipc gfansqnsi selvvfwqdg
61 enivineyl gkekdsvhbs kymgrtsds dswtlihnl qikdkqlyqc lihhkkptgm
121 irihemssel svlanfsqpe ivyinsnit en vyinltessi hgypepkms virtknsti
181 eydqimqksq dnytelydvs islsvsfpdv tsamtifcil etdktrllss psielepdq
241 pppdhipwit avlptwicv myfclilkwk kikkpknosy kegtutnare eseqtkkrek
301 thiwersdea qrvfkssts sedkstdet

(SEQ ID NO:193)

FIGURA 56

Ligando Fas (FasL)
Homo sapiens
GenBank NP_00630
Aminoácidos 1-281

1 mgqpfinycyp qiywqccssas sowappgtvl peptsvorrp gqerrpppppp ppplpppppp
62 pplppplipp lkkrguhbsty lclivuffmy lvalvlgig nifqlfbliqe laelrestsq
121 rhtassliekq ighpspppek kelrkvahlt gksnrsrsmpl ewedtqgivi lsgvkykkqg
181 lvinetqlyf vyskvyrqgq scnnplsk vymanskypq dlvtnaqskam svcttgqmw
241 rssylygavfn itsadhiyvn vseislyne esqtfflyk i

(SEQ ID NO:194)