

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 262**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)
C07K 14/715	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2018 PCT/US2018/000085**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018 WO18151868**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2018 E 18710585 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3583125**

54 Título: **Proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina**

30 Prioridad:

16.02.2017 US 201762459975 P
16.02.2017 US 201762459981 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2025

73 Titular/es:

SONNET BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.00%)
100 Overlook Center, Suite 102
Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

CINI, JOHN, K. y
HUANG, HAOMIN

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 3 018 262 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

Proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina

5 Antecedentes

Si bien los productos biológicos han sido útiles en el tratamiento de muchas enfermedades, que incluyen los cánceres, la corta semivida circulatoria de tales moléculas representa un gran obstáculo.

10 Los productos biológicos son útiles para el tratamiento de cánceres de varias maneras. Las terapias basadas en citocinas pueden funcionar directamente en las células cancerosas al interferir con la forma en que tales células crecen y se multiplican. Las citocinas también pueden estimular el sistema inmunitario, al fomentar el crecimiento de células T citotóxicas y otras células que atacan a las células cancerosas. Además, las citocinas pueden promover que las células cancerosas envíen sustancias químicas que atraen a las células del sistema inmunitario. Ver, por ejemplo, Dranoff, Nature Reviews Cancer 4: 11-22 (2004); y Zhang y otros, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 106(18): 7513-7518 (2009). Los anticuerpos son convenientes como productos terapéuticos debido a su capacidad para reconocer dianas con alta especificidad y afinidad. Las terapias basadas en anticuerpos monoclonales, que incluyen aquellas que se dirigen a antígenos de superficie tumoral y señales inhibitorias que limitan la activación de células T, han sido un componente estándar de los productos terapéuticos contra el cáncer durante más de 20 años. Ver, por ejemplo, Weiner, Nat Rev Cancer 15(6): 361-370 (2015).

La semivida circulatoria corta representa un gran obstáculo para muchos productos biológicos. Ver, por ejemplo, Perdreau y otros, European Cytokine Network 21: 297-307 (2010). Tales productos terapéuticos de acción corta requieren perfiles de dosificación frecuente que pueden reducir la aplicabilidad a la clínica, en particular para afecciones crónicas. La larga semivida en suero es conveniente, ya que disminuiría la necesidad de inyecciones repetidas de la molécula para lograr una concentración sérica terapéuticamente relevante. Los métodos para extender la semivida de las proteínas terapéuticas incluyen la PEGilación, la fusión a la albúmina sérica humana (HSA), la fusión al fragmento constante (Fc) de una inmunoglobulina humana IgG y la fusión a polipéptidos no estructurados tales como XTEN. Ver, por ejemplo, Stohl, BioDrugs 29(4): 215-239 (2015). Las tecnologías de extensión de la semivida permiten terapias biológicas nuevas y mejoradas que reducen el costo y la carga de la dosificación frecuente. Por lo tanto, persiste la necesidad continua de reactivos y métodos novedosos útiles para extender las semividas de los productos terapéuticos basados en proteínas y péptidos.

El documento WO2013/068571 describe anti-scFv de unión a albúmina sérica.
 35 Emma Dave y otros, "Fab-dsFv: A bispecific antibody format with extended serum half-life through albumin binding, MABS, vol. 8, núm. 7, 17 de agosto de 2016, páginas 1319-1335, describe el uso de anticuerpos en formato Fab-Fv y Fab-dsFv que incluyen una región Fv anti-albúmina sérica humana (HSA) y una región Fab.
 Meghan Cundall, "Production of single-chain anti-albumin antibodies for use in protein stabilization", National Library of Canada, 1 de enero de 1998, describe dos proteínas de fusión en las que IL-2 se conjuga a un scFv de unión a albúmina.
 40 Junko Muraoka y otros, "Selection and Characterization of Human Serum Albumin-specific Porcine scFv Antibodies Using a Phage Display Library", Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, vol. 33, núm. 1, 1 de febrero de 2014, páginas 42-48, describe cuatro scFv de unión a albúmina diferentes basados en cuatro anticuerpos monoclonales parentales conocidos por unirse a la albúmina sérica.
 45 DATABASE WPI Week 201351 Thomson Scientific, Londres, GB: AN 2013-G09119 & CN102875675A (BAIMING SUZHOU BIOTECHNOLOGY CO LTD) 16 de enero de 2013 describe scFv de unión a albúmina sérica.

Resumen

50 La invención es una composición que comprende un dominio de unión a albúmina (ABD) de

```

EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSN
SGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGG
55 AFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSHSSYVLTQPPSVSVAPGQTA
TTCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLLVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLT
ISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG.
    
```

60 La invención es una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina (ABD) que comprende un ABD de
 EVQLVESGGGLIQ PGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYI
 GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAED TAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQG
 TMVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITC GGNIGTKS
 VHWHYQQKPGQAPVLLVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV
 65 WDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG unido a una primera pareja de fusión.

En una modalidad, la primera pareja de fusión es una citocina.

En una modalidad, la primera pareja de fusión es un scFv que comprende una cadena pesada variable de scFv y una cadena ligera variable de scFv.

5 En una modalidad, la proteína de fusión del dominio de unión a albúmina comprende una segunda proteína de fusión que se une al ABD.

En una modalidad, la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión son cada una, una citocina.

10 En una modalidad, la proteína es de acuerdo con la fórmula: (FP1)-L1-(ABD)-L2-(FP2), en donde el ABD es una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina; en donde FP1 y FP2 son la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión, respectivamente; y en donde L1 y L2 son un primer y un segundo enlazador, respectivamente.

15 En una modalidad, la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión son cada una, una citocina.

En una modalidad, el primer resto de unión y el segundo resto de unión son cada uno, un scFv.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica dicho dominio de unión a albúmina.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para fabricar un dominio de unión a albúmina, que comprende cultivar dicha célula huésped en condiciones en donde se produce el dominio de unión a albúmina y recuperar el dominio de unión a albúmina.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina descrita en la presente descripción.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para fabricar una proteína de fusión de ABD, que comprende cultivar dicha célula huésped en condiciones en donde se produce la proteína de fusión de ABD y recuperar la proteína de fusión de ABD.

Breve descripción de los dibujos

40 La invención se define en las reivindicaciones. Cualquiera de las siguientes Figuras que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención y se proporcionan solo con fines comparativos.

45 Las Figuras 1A-C ilustran varias proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina ilustrativas descritas en la presente descripción, que incluyen proteínas de fusión donde un dominio de unión a albúmina se une a una citocina (por ejemplo, IL-12 o IL-15) y proteínas de fusión donde un dominio de unión a albúmina se une a 1) dos citocinas; 2) dos restos de unión (por ejemplo, scFv); 3) un resto de unión y una citocina.

50 Las Figuras 2A -2Z muestra las secuencias de dominios de unión a albúmina ilustrativos incluidos en determinadas modalidades de las proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina objeto descritas en la presente descripción. En estas figuras se incluyen las secuencias de dominio pesado variable y dominio ligero variable, así como también las secuencias particulares vHCDR1-3 y vLCDR1-3.

La Figura 3 muestra las secuencias de variantes de IL-15 ilustrativas descritas en la presente descripción.

La Figura 4 muestra modalidades ilustrativas de las proteínas de fusión IL-15-ABD descritas en la presente descripción. Las proteínas de fusión IL-15-ABD representadas en la Figura 4 incluyen ABD A10m3.

55 La Figura 5 representa los resultados de estudios que muestran que la transcripción no explica la baja expresión de IL-15-A10m3 en células HEK293T. Verificación del ARNm de IL15-A10m3 en células transfectadas. A) La expresión de IL15-A10m3 en HEK293 no puede detectarse mediante transferencia de Western mediante el uso de anticuerpo anti-etiqueta His (izquierda), o mediante unión ELISA funcional a MSA (derecha). M: Marcador, CK: medio de cultivo no transfectado como control, 1-3: medio de 3 cultivos celulares transfectados independientemente (100, 200 y 250 = 100, 200, 250 ug/ml de Zeocina, respectivamente). Sirvió como control positivo 10 ug/ml de IL15-A10m3 producida en E. coli. B) Se preparó ARNm a partir de 4 células transfectadas independientemente con IL15-A10m3 y se realizó RT-PCR para cuantificar el nivel de ARNm de ARNm de IL15-A10m3 en comparación con el de un gen constitutivo, GAPDH. Carril 1) control de células no transfectadas; 2-5) La transcripción del ARNm de IL15-A10m3 parece ser normal en todas las células transfectadas; 6) control positivo de ARNm de GAPDH.

65 La Figura 6 representa la identificación de los sitios de ubiquitinación potenciales de IL-15 que se protegen supuestamente por el receptor alfa de IL-15 (IL-15R α) que se une a IL-15. (A) K86 en rojo es un sitio de ubiquitinación supuesto que está junto a los sitios de unión de IL-15R α (marcados por estrellas); (B) K86 es un

acuerdo para la ubiquitinación de UbPred, una base de datos de sitios de ubiquitinación en línea (www.ubpred.org).

La Figura 7 proporciona ilustraciones esquemáticas de varias proteínas de fusión IL-15-ABD con estabilidad mejorada descritas en la presente descripción, que incluyen una IL-15-ABD con un par de fusión "dominio sushi" IL-15Ra/IL15 (A) y proteínas de fusión IL-15-ABD que incluyen parejas de fusión de variantes de IL-15 que tienen sustituciones de aminoácidos en el sitio de ubiquitinación supuesto K86 (B).

La Figura 8 representa estudios que evalúan el nivel de expresión (Figura 8A) y la capacidad de las variantes de IL-15-ABD K86R y K86A producidas por células HEK293 e IL-15Rα/IL-15-ABD para unirse a la albúmina sérica de ratón (Figura 8A) e IL-15Rα (Figura 8B). A) Lectura de ELISA para la unión de IL-15-ABD a la albúmina sérica de ratón (MSA) de 12 clones de IL15 WT-A10m3 (WT), 12 clones de IL-15Rα/IL-15-A10m3 (IL15Ra), 6 clones mutantes de IL-15 K86A-A10m3 (K86A) y 6 clones mutantes de IL-15 K86R-A10m3 (K86R). Se añadió medio de cultivo de cada pocillo de muestra de placas de 24 pocillos a placas de ELISA recubiertas con MSA. B) El ELISA para la unión de IL-15 al receptor alfa de IL-15 (IL-15Rα) que se recubrió en la placa se usó para confirmar que las mutaciones K86A (clon A3, estrella amarilla) y K86R (clon R6, estrella verde) no tuvieron impacto en la actividad de unión de IL-15 a IL-15Rα. El IL-15Rα interno en IL-15Rα -IL-15-A10m3 (clon alfa1, estrella roja) podría unirse a IL15 interna y por lo tanto bloquear su unión a IL-15Rα recubierto en la placa. Se usó como control positivo 10 ug/ml de IL WT-15-A10m3 producido en *E. coli*.

La Figura 9 representa la producción a gran escala del clon #6 de IL15K86R-A10m3. A) Cromatografía de IL15K86R-A10m3 mediante una columna de exclusión por tamaño; B) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones SEC de 14 a 42; C) Los productos finales (1: IL15K86R-A10m3, 2: IL15Ra-IL15-A10m3) se confirmaron finalmente mediante SDS-PAGE (izquierda) y transferencia de Western con anticuerpo anti-etiqueta His (derecha).

La Figura 10 representa los resultados de ensayos de unión *in vitro*, que confirman la capacidad de IL-15 K86R-A10m3 para unirse a la albúmina sérica de ratón (MSA).

La Figura 11 representa los resultados de los ensayos de proliferación de CTLL2, que muestran que los polipéptidos IL-15 K86R -A10m3 producidos a partir de células HEK293T tienen una bioactividad reducida en comparación con la IL-15 de tipo silvestre e IL-15-A10m3 producidas a partir de *E. coli*.

La Figura 12 representa los resultados de estudios que muestran que la bioactividad reducida de IL-15 K86R -A10m3 producida por células HEK se debe al menos parcialmente a su glucosilación.

La Figura 13 proporciona los resultados de los estudios, que muestran que la mutación N112A introducida en IL15 K86R-A10m3 puede restaurar la bioactividad de IL-15 comparable a la de IL-15R-A10m3 desglucosilada en ensayos de proliferación de CTLL2 (A). (B) muestra además que las proteínas de fusión IL-15R-A10m3 con las sustituciones de aminoácidos de IL-15 N112A, N112Q y N112S mostraron una bioactividad aumentada inversamente proporcional al tamaño de la cadena lateral sustituida.

La Figura 14 representa la configuración experimental de un estudio para evaluar los efectos *in vivo* de IL-15 e IL-15-ABD sobre el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma de ratón B16-F10.

La Figura 15 es un gráfico, que muestra la cantidad de inhibición del crecimiento del tumor B16-F10 en ratones C57BL/6 tratados con la proteína de fusión IL-15-ABD, 11 días después del tratamiento.

La Figura 16 proporciona análisis FACS, que representan el efecto del tratamiento con IL-15-ABD en poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor.

Las Figuras 17 y 18 proporcionan un resumen de los efectos del tratamiento con IL-15-ABD en poblaciones de linfocitos en bazos y tumores.

Las Figuras 19A y B proporcionan los resultados de estudios que muestran la estabilidad de la IL-15-ABD en un modelo de ratón (A) y en suero humano (B), en comparación a la IL-15 WT de control.

La Figura 20 representa las secuencias de IL-12-ABD ilustrativas descritas en la presente descripción: mL12sc-A10m3 e IL humana-12sc-A10m3.

Las Figuras 21 y 22 son estudios que muestran que la IL-12-ABD objeto producida a partir de células HEK293T son biológicamente activas en ensayos *in vitro* y ensayos basados en células.

La Figura 23 representa la configuración experimental de un estudio para evaluar los efectos *in vivo* de IL-12 e IL-12-ABD sobre el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma de ratón B16-F10. Se usaron concentraciones molares similares de IL-12 e IL-12 a tres concentraciones diferentes. Por ejemplo, 3 µg de IL-12 tiene la misma concentración molar que 4,5 µg de IL-12-ABD, 10 µg de IL-12 tiene la misma concentración molar que 15 µg de IL-12-ABD y 20 µg de IL-12 es la misma concentración molar que 30 µg de IL-12-ABD. El peso molecular de IL-12 es 70 kD y el peso molecular de IL-12-ABD es 107 kD.

La Figura 24 son gráficos que representan la cinética del crecimiento tumoral de varios grupos en los estudios *in vivo* con IL-12-ABD/IL-12.

La Figura 24A muestra los resultados de las evaluaciones del tamaño del tumor en los grupos IL-12 e IL-12-ABD, la Figura 24B muestra los grupos de tratamiento con IL-12 por separado y la Figura 24C muestra los grupos de tratamiento con IL-12-ABD por separado.

La Figura 25 son gráficos que representan la cinética del crecimiento tumoral de animales individuales en cada uno de los diversos grupos de los estudios *in vivo* con IL-12-ABD/IL-12.

La Figura 26 son gráficos que muestran los volúmenes tumorales de varios grupos en los estudios *in vivo* con IL-12-ABD/IL-12, 10 días después del tratamiento.

La Figura 27 representa las mediciones de peso corporal longitudinal (izquierda) y % de peso corporal (derecha) en ratones portadores de tumores B16-F10 en varios puntos de tiempo después del tratamiento con IL-12 o IL-12-ABD.

La Figura 28 proporciona curvas de pseudo-supervivencia de Kaplan-Meier para varios grupos en los estudios *in vivo* con IL-12-ABD/IL-12.

La Figura 29 representa un resumen de estudios que comparan los efectos farmacodinámicos de una dosis única de IL-12-ABD frente a IL-12 en ratones portadores de tumores B16-F10 a los cinco días. Se muestran las comparaciones del peso del tumor, el peso del bazo, el IFN- γ en suero y el peso corporal.

La Figura 30 muestra el resultado de un estudio que compara el volumen tumoral de ratones portadores de tumores B16-F10 a los 10 días, inyectados con IL-12-ABD (1,3 μ g), IL-12 (30 μ g), o placebo. La IL-12-ABD se administra a una dosis molar más baja ~30 veces que IL-12 en este estudio.

La Figura 31 representa además los efectos hematopoyéticos de IL-12-ABD e IL-12 en ratones del estudio representados en la Figura 32 a los 3 y 7 días.

La Figura 32 representa un estudio, que muestra el efecto de terapias combinadas de dosis única mediante el uso de IL-12-ABD o IL-12 con anticuerpos anti-PD-1 sobre el crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores B16-F10.

La Figura 33 representa los resultados de un análisis de suero, que muestra un aumento en la PK para IL12-ABD sobre IL-12 WT.

La Figura 34 representa las secuencias de IL-15-ABD-IL-12 objeto ilustrativas descritas en la presente descripción: 1) hIL-15 (K86R/N112A)-A10m3-mIL-12sc; 2) mIL-12sc-A10m3- hIL-15 (K86R); y 3) mIL-12sc-A10m3- hIL-15 (K86R/N112A).

La Figura 35 muestra las actividades de unión tanto de hIL-15 (K86R)-A10m3-mIL-12sc como mIL-12sc -A10m3- hIL-15 (K86R) a MSA (A), receptor alfa IL-15 y receptor beta2 IL-12 (B), según se confirma por ELISA.

La Figura 36 representa las secuencias de IL-15-ABD-IL-12 objeto ilustrativas adicionales descritas en la presente descripción: 1) hIL-15 (K86R)-A10m3-hIL-12sc; 2) hIL-12sc-A10m3- hIL-15 (K86R); y 3) hIL-12sc-A10m3- hIL-15 (K86R/N112A).

Las Figuras 37 y 38 representan los resultados de experimentos que muestran que la IL-15-ABD-IL-12 descrita en la presente descripción exhibe tanto actividad de IL-12 (Figura 39) como de IL-15 (Figura 40).

La Figura 39 representa los resultados de un estudio, que muestra que la IL-15-ABD-IL-12 descrita en la presente descripción mostró una actividad superior en comparación con IL-12-ABD sola.

Las Figuras 40A y B representan las secuencias de dos dominios de unión a TGF β ilustrativos descritos en la presente descripción: 4H7 y 4D9, que incluyen secuencias de formato de cadena pesada variable, cadena ligera variable y scFv.

La Figura 41 representa los resultados de un estudio, que muestra que los scFv de TGF β descritos en la presente descripción son capaces de bloquear la expansión de Treg inducida por TGF β 1 (CD4+Foxp3+).

Las Figuras 42 y 43 muestran que el bloqueo de TGF- β revierte la transición epitelial a mesenquimal inducida por TGF- β 1 (Figura 44) y la migración (Figura 45). (Figura 42A) Representación esquemática de la pérdida de E-cadherina y la expresión inducida de vimentina durante EMT. (Figura 44B) Las células 4T1 de ratón se cultivaron en medio de crecimiento suplementado con TGF- β 1 solo o con 1D11 (panel 3) o scFv anti-TGF- β 1 (panel 4), después se fijaron y se tiñeron con anticuerpo contra E-cadherina (verde) y anticuerpo contra vimentina (púrpura). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). El tratamiento con TGF- β 1 indujo la pérdida de E-cadherina de las uniones célula-célula y aumentó la expresión de vimentina. Este efecto se revierte mediante la adición de 1D11 o el scFv anti-TGF- β 1 objeto descrito en la presente descripción. La Figura 43 muestra además que los scFv anti-TGF- β 1 objeto descritos en la presente descripción bloquean la migración de células de carcinoma mediada por TGF- β 1.

La Figura 44 proporciona un resumen de estudios que muestran que los scFv anti-TGF- β 1 objeto descritos en la presente descripción son capaces de inhibir la fosforilación de Smad2 mediada por TGF- β en células humanas (A) y de ratón (B). En A, los scFv anti-TGF- β 1 objeto fueron capaces de inhibir la fosforilación de Smad2 mediada por TGF- β 1 en células humanas de una manera dependiente de la dosis. En B, los scFv anti-TGF- β 1 objeto fueron capaces de inhibir la fosforilación de Smad2 mediada por TGF- β 1, - β 2 y - β 3 en células de ratón.

La Figura 45A representa las secuencias de constructos de scFv de TGF- β 1-ABD ilustrativos (4D9M-A6m y 4H7-A6m).

La Figura 45B proporciona un resumen de un estudio, que muestra que anti-TGF- β 1-ABD extiende el scFv anti-TGF- β 1.

La Figura 46 proporciona un resumen de un estudio, que muestra que varios anti-scFv de TGF- β 1-ABD (bivalente para TGF- β 1) producidos en células de E. Coli o de mamíferos (HEK) son capaces de unirse a la albúmina sérica de ratón.

La Figura 47 proporciona el resumen de un estudio, que muestra que la inhibición mediada por TGF- β 1 de la proliferación de células T se revirtió (es decir, aumentó la proliferación de células T) mediante constructos ilustrativos de scFv de TGF- β 1-ABD (4D9M-A6m y 4H7-A6m).

La Figura 48 representa enlazadores ilustrativos que pueden usarse con las proteínas de fusión objeto. Tales enlazadores pueden usarse como enlazadores de scFv para la cadena pesada variable y las cadenas ligeras variables de ABD. Tales enlazadores también pueden usarse para unir los dominios de unión a albúmina descritos en la presente descripción a las parejas de fusión IL-12 e IL-15 o para conectar componentes de las parejas de fusión de IL-12 (p35 y p40) o las parejas de fusión de IL-15 (IL-15 e IL-15R α) entre sí.

La Figura 49A-G proporciona la secuencia de aminoácidos de citocinas ilustrativas que pueden incluirse en las proteínas de fusión de ABD descritas en la presente descripción. También se representan en las Figuras 49A-G proteínas de fusión citocina-ABD ilustrativas donde el ABD es A10m3. Aunque tales proteínas de fusión

citocinas-ABD se representan con ABD A10m3, cualquier ABD, que incluye el ABD descrito en la presente descripción, puede incluirse en las proteínas de fusión citocinas-ABD.

La Figura 50 proporciona la secuencia de aminoácidos de un anti-dominio de unión PD-L1 ilustrativo, 10D12, que puede usarse con las proteínas de fusión de ABD descritas en la presente descripción. 10D12 se une a hPD-L1 a pH bajo y tiene reacción cruzada con mPD-L1. 10D12 no se une a hPD-L2 o mPD-L2. Además, 10D12 bloquea la interacción PD-1/PD-L1, así como también la interacción B71/PD-L1.

Las Figuras 51A y B representan varias combinaciones útiles de citocina-ABD-citocina (A) y resto de unión-ABD-citocina/resto de unión (B). "A" y "B" en cada combinación pueden cambiarse a la orientación opuesta. También se representa en estas figuras una cadena principal enlazador-A10m3-enlazador que puede incluirse en las combinaciones de citocina-ABD-citocina y resto de unión-ABD-citocina/resto de unión. Aunque se representa A10m3 ABD, puede usarse en tales constructos cualquier ABD, que incluye cualquiera de los representados en la presente descripción (por ejemplo, Figura 2).

Descripción detallada

A. Descripción general

Los productos biológicos, que incluyen los productos terapéuticos basados en citocinas y anticuerpos, son útiles para el tratamiento de los cánceres.

Los productos terapéuticos basados en citocinas actuales y potenciales incluyen aquellos que utilizan IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 GM-CSF e IFN- α .

IL-12 es capaz de mediar funciones efectoras inmunitarias de una manera compatible con el aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral endógena proinflamatoria. (Ver, por ejemplo, Boggio y otros, *J Exp Med* 188:589-96 (1998); Cavallo y otros, *Cancer Res* 59:414-21 (1999); Yu y otros, *Int Immunol* 8:855-65 (1996); Nastala y otros, *J Immunol* 153:1697:706 (1994); Brunda y otros, *J Exp Med* 178. 1223-30 (1993). Se conoce que IL-12 induce una respuesta de células T CD4+ Th1 inflamatoria, así como también mejora la citotoxicidad de células T CD8+. Los estudios también han demostrado que la secreción de IFN γ por parte de las células T mediada por IL-12 puede invertir la anergia de las células T y conferir resistencia de las células T efectoras a las células T reguladoras inmunosupresoras. La capacidad de IL-12 no solo activa los sistemas inmunitarios adaptativo e innato, sino que también modula además el microambiente tumoral de cualquier otra manera inmunohostil hace a la IL-12 un candidato ideal para la inmunoterapia contra el tumor.

IL-15 es capaz de estimular la proliferación de células T dentro de los tumores (ver, por ejemplo, Miecznik y otros, *Sci Transl Med* 6(228):228ra37 (2014) así como también extender la supervivencia de las células T CD8+ de memoria efectoras y es fundamental para el desarrollo de células NK. Por lo tanto, se cree que la IL-15 puede aumentar la potencia de los inhibidores de puntos de regulación y otras inmunoterapias que aprovechan las células T para atacar a las células cancerosas. El monómero de IL-15, sin embargo, tiene una semivida corta de menos de 40 minutos *in vivo*. Las modificaciones al monómero de IL-15 pueden mejorar su farmacocinética *in vivo* en el tratamiento de cánceres. Estas modificaciones generalmente se han centrado en mejorar la trans-presentación de IL-15 con la subunidad alfa del receptor de IL-15, IL-15R α . Tales modificaciones incluyen: 1) preasociación de IL-15 y su fusión a la subunidad α del receptor soluble-Fc para formar el complejo IL-15: IL-15R α -Fc (ver, por ejemplo, Rubinstein y otros, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103:9166-71 (2006)); 2) expresión de los hiperagonistas IL-15-sIL-15R α -proteína sushi (ver, por ejemplo, Bessard y otros, *Molecular cancer therapeutics* 8: 2736-45 (2009)); y 3) preasociación de mutante de IL-15 humana IL-15N72D con el complejo de fusión IL-15R α -Fc sushi-Fc (ver, por ejemplo, Zhu y otros, *Journal of Immunology* 183: 3598-6007 (2009)).

Las terapias basadas en anticuerpos monoclonales, que incluyen aquellas que se dirigen a antígenos de superficie tumoral y señales inhibitorias que limitan la activación de células T, han sido un componente estándar de los productos terapéuticos contra el cáncer durante más de 20 años. Ver, por ejemplo, Weiner, *Nat Rev Cancer* 15(6): 361-370 (2015).

La semivida circulatoria corta representa un gran obstáculo para muchos productos biológicos, que incluyen los productos terapéuticos basados en citocinas y anticuerpos. Ver, por ejemplo, Herrington-Symes y otros, *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4: 689-698 (2013) y Perdreaux y otros, *European Cytokine Network* 21: 297-307 (2010). Tales productos terapéuticos de acción corta requieren perfiles de dosificación frecuente que pueden reducir la aplicabilidad a la clínica, en particular para afecciones crónicas. La larga semivida en suero es conveniente, ya que disminuiría la necesidad de inyecciones repetidas de la molécula para lograr una concentración sérica terapéuticamente relevante. Los métodos para extender la semivida de las proteínas terapéuticas incluyen la PEGilación, la fusión a la albúmina sérica humana (HSA), la fusión al fragmento constante (Fc) de una inmunoglobulina humana IgG y la fusión a proteínas de fusión no estructuradas tales como XTEN. Ver, por ejemplo, Stohl, *BioDrugs* 29(4): 215-239 (2015). Las tecnologías de extensión de la semivida permiten terapias biológicas mejoradas o nuevas que reducen el costo y la carga de la dosificación frecuente. Por lo tanto, persiste la necesidad de reactivos y métodos novedosos que puedan extender las semividas de los productos terapéuticos basados en proteínas y péptidos.

En la presente descripción se proporcionan proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina (ABD) novedosas, útiles para extender las semividas de los productos biológicos (por ejemplo, interleucinas y anticuerpos). La albúmina sérica posee una larga semivida en el intervalo de 2-4 semanas debido al reciclaje a través del receptor Fc neonatal (FcRn). La albúmina es captada por las células endoteliales a través de la macropinocitosis y se une al FcRn de una manera dependiente del pH en el ambiente ácido del endosoma temprano. La unión de albúmina a FcRn desvía las moléculas de albúmina de la degradación en el compartimiento lisosomal y redirige las moléculas de albúmina a la membrana plasmática, donde se liberan de nuevo al plasma sanguíneo debido al pH neutro.

Los dominios de unión a albúmina (ABD) descritos en la presente descripción no compiten con FcRn por la unión a albúmina y se unen a la albúmina en un intervalo de pH que permite que el ABD también experimente reciclaje de albúmina endosomal impulsado por FcRn cuando se une a la albúmina. Como tal, los productos biológicos que incluyen el dominio de unión a albúmina (ABD) objeto son capaces de evadir la degradación lisosomal mediante el uso de la vía de albúmina-FcRn y, en consecuencia, presentan semividas séricas más largas que las contrapartes que carecen de ABD.

Además, tales productos terapéuticos que contienen ABD se localizan ventajosamente a los tumores, que se conoce que contienen altos niveles de albúmina sérica. Por lo tanto, tales productos terapéuticos que contienen ABD son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres.

B. Dominios de unión a albúmina

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones que incluyen un dominio de unión a albúmina. Como se usa en la presente, "albúmina sérica" se refiere a un miembro de una familia de proteínas globulares producidas por el hígado que funcionan principalmente como una proteína portadora de esteroides, ácidos grasos y hormonas tiroideas en la sangre. La albúmina sérica también puede jugar un papel principal en la estabilización del volumen de fluido extracelular mediante la contribución a la presión oncótica del plasma, e incluye pero no se limita a, la albúmina sérica humana (HSA, números de acceso a Genbank: NM_000477 y NP_000468) y albúmina sérica de ratón (MSA, números de acceso a Genbank: NM_009654 y NP_0033784). La estructura de la albúmina se caracteriza por varias hélices α largas y contiene once dominios de unión distintos para compuestos hidrófobos. En seres humanos, la albúmina sérica está codificada por el gen ALB.

Las proteínas de fusión que incluyen el dominio de unión a albúmina (ABD) objeto pueden unirse a la albúmina sérica (SA), lo que permite que la proteína de fusión sea absorbida por las células por macropinocitosis. En determinadas modalidades, los ABD descritos en la presente descripción se unen en un intervalo de pH de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 7,2. En el endosoma temprano, tales proteínas de fusión de ABD unidas a SA se unen a FcRn a través de SA a un pH ácido (por ejemplo, pH 5,5), que a su vez desvía la proteína de fusión de ABD unida a SA del compartimiento de lisosoma de la célula y de regreso a la membrana plasmática. En la membrana plasmática, la SA se disocia de FcRn debido al pH neutro (por ejemplo, pH 7,1-7,5) y la proteína de fusión de SA y ABD se libera de nuevo al torrente sanguíneo. Como los productos terapéuticos que incluyen el ABD objeto son capaces de unirse a la albúmina en un intervalo de pH de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 7,2, tales productos terapéuticos también se someten ventajosamente al reciclaje endosomal de albúmina impulsado por FcRn y, por lo tanto, evaden la degradación lisosomal. En consecuencia, los productos terapéuticos que incluyen tales ABD exhiben ventajosamente semividas séricas más largas que sus contrapartes que carecen de ABD. Tales productos terapéuticos son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres, que se conoce que contienen altos niveles de albúmina sérica.

En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina se une a la albúmina en un sitio que no interfiere con la unión de SA a un receptor Fc neonatal (FcRn). Por "FcRn" o "receptor Fc neonatal" como se usa en la presente descripción, se entiende una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y se codifica al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede ser de cualquier organismo, que incluye, pero no se limita a, humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos proteínas de fusión, a menudo denominadas cadena pesada y cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen FcRn. A menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina.

En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina descrito o ejemplificado en la presente descripción se une preferentemente de manera específica a la albúmina sérica (por ejemplo, HSA) en un epítipo de la molécula de albúmina sérica que no participa en la interacción de la molécula de albúmina sérica con el FcRn. La unión del resto de unión SA a la molécula de albúmina sérica por lo tanto preferentemente no interfiere, inhibe, evita o reduce de cualquier otra manera sustancialmente la unión de la molécula de albúmina sérica (por ejemplo, IISA) con el FcRn. Preferentemente, el dominio de unión a albúmina no compete con el FcRn por la unión a la molécula de albúmina sérica. Preferentemente, el dominio de unión a albúmina no inhibe estéricamente la unión de la albúmina sérica al FcRn. Preferentemente, el resto de unión a SA no cambia la conformación de la molécula de albúmina sérica de manera que la albúmina no pueda interactuar con el FcRn.

En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina se une a SA (por ejemplo, HSA) a un pH de $5,0 \pm 0,1$, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0. En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina se une a SA en un intervalo de pH de aproximadamente pH 5,5-aproximadamente pH 7,2. En algunas modalidades, el resto de unión a SA se une a SA a un pH de 5,5.

En determinadas modalidades, el dominio de unión a albúmina es un dominio de unión a albúmina sérica humana (HSA). Los dominios de unión a HSA incluyen, pero no se limitan a, dominios de unión a albúmina que pueden unirse a una molécula de HSA tal como una molécula de HSA completa o un fragmento de una HSA. En algunas modalidades, el dominio de unión a HSA también se une a la albúmina sérica de ratón. En algunas modalidades, el dominio de unión a HSA también se une a la albúmina de mono cyno. En determinadas modalidades, el dominio de unión a HSA no se une a la albúmina sérica bovina (BSA).

Los dominios de unión a albúmina proporcionados en la presente descripción pueden incluir una cadena pesada variable sola o una cadena pesada variable en asociación con una cadena ligera variable. En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina incluye una cadena pesada variable. En determinadas modalidades, la cadena pesada variable incluye una vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 (Regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada variable 1-3). En determinadas modalidades, el dominio de unión a antígeno también incluye una cadena ligera variable. En determinadas modalidades, la cadena ligera variable incluye una viCDR1, viCDR2 y viCDR3 (Regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera variable 1-3).

En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina incluye una cadena pesada variable que incluye las vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de cualquiera de las cadenas pesadas variables representadas en la Figura 2. En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina incluye las vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de una cadena pesada variable A10m3, como se muestra en la Figura 2D. En determinadas modalidades, el dominio de unión a albúmina incluye las vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de A10m3 como se muestra en la Figura 2D.

En determinadas modalidades, el dominio de unión a albúmina también incluye una cadena ligera variable. En una modalidad ilustrativa, el dominio de unión a albúmina incluye una cadena ligera variable que incluye las viCDR1, viCDR2 y viCDR3 de cualquiera de las cadenas ligeras variables representadas en la Figura 2. En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina incluye la viCDR1, viCDR2 y viCDR3 de una cadena ligera variable A10m3, como se muestra en la Figura 2D. En determinadas modalidades, el dominio de unión a albúmina incluye la viCDR1, viCDR2 y viCDR3 de A10m3 como se muestra en la Figura 2D.

En determinadas modalidades, el dominio de unión a albúmina (por ejemplo, dominio de unión a HSA) es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina (por ejemplo, dominio de unión a HSA) es un scFv.

En algunas modalidades en las que el ABD incluye una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable se unen entre sí mediante un enlazador (por ejemplo, un enlazador scFv). En determinadas modalidades, el enlazador se une a la cadena pesada variable en su extremo C-terminal y la cadena ligera variable en su extremo N-terminal. Los enlazadores adecuados se describen en la presente descripción y en la Figura 48. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador (Gly4Ser)_x, donde x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En determinadas modalidades, el enlazador es un enlazador (Gly4Ser)₅.

En determinadas modalidades, el dominio de unión a albúmina también incluye una cadena pesada variable que incluye vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de A10m3 y una cadena ligera variable que incluye viCDR1, viCDR2 y viCDR3 de A10m3 (Figura 2D). En una modalidad, el dominio de unión a albúmina incluye la secuencia pesada variable y la secuencia ligera variable del ABD A10m3 representado en la Figura 2D.

C. Variantes de interleucina-15

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones que incluyen variantes de IL-15 con estabilidad y/o actividad biológica *in vivo* mejoradas en comparación con la IL-15 de tipo silvestre.

Como se usa en la presente, "interleucina 15", "IL-15" e "IL15" se refieren a una interleucina que se une a y señala a través de un complejo compuesto de una cadena del receptor alfa específico de IL-15, una cadena beta del receptor IL-2/IL-15 (CD122) y la cadena gamma común (gamma-C, CD132) (números de acceso de Genbank: NM_00000585 y NP_000576 (humano); y NM_001254747 y NP_001241676 (ratón)).

IL-15 ha demostrado estimular la proliferación de células T dentro de los tumores (ver, por ejemplo, Miecnik y otros, *Sci Transl Med* 6(228):228ra37 (2014)). La IL-15 también es capaz de extender la supervivencia de las células T CD8+ de memoria efectoras y es fundamental para el desarrollo de las células NK. Se cree que IL-15 puede aumentar la potencia de los inhibidores de puntos de control y otras inmunoterapias que aprovechan las células T para atacar las células cancerosas. Por lo tanto, sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que las IL-15 descritas en la presente descripción son útiles para el tratamiento de cánceres.

El monómero de IL-15, sin embargo, tiene una semivida corta de menos de 40 minutos *in vivo*. Las modificaciones al monómero de IL-15 pueden mejorar su farmacocinética *in vivo* en el tratamiento de cánceres. Estas modificaciones generalmente se han centrado en mejorar la *trans*-presentación de IL-15 con la subunidad alfa del receptor de IL-15, IL-15R α . Tales modificaciones incluyen: 1) la preasociación de IL-15 y su fusión y su fusión a la subunidad α del receptor soluble-Fc para formar el complejo IL-15: IL-15R α -Fc (ver, por ejemplo, Rubinstein y otros, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 103:9166-71 (2006)); 2) expresión de los hiperagonistas IL-15-sIL-15R α -proteína sushi (ver, por ejemplo, Bessard y otros, Molecular cancer therapeutics 8: 2736-45 (2009)); y 3) preasociación de mutante de IL-15 humana IL-15N72D con el complejo de fusión IL-15R α -Fc sushi-Fc (ver, por ejemplo, Zhu y otros, Journal of Immunology 183: 3598-6007 (2009)).

En algunas modalidades, la IL-15 es una variante de una IL-15 parental con estabilidad aumentada en comparación con la IL-15 de tipo silvestre. En modalidades particulares, la variante de IL-15 es una variante de una IL-15 humana de tipo silvestre. En una modalidad ilustrativa, la variante de IL-15 incluye una sustitución de aminoácido en la posición K86 de la IL-15 parental mostrada en la Figura 3. Como se describe en la presente descripción, K86 es un sitio supuesto para la degradación dependiente de ubiquitina (ver Ejemplo 2) cuando se fabrican mediante el uso de tipos de células particulares (por ejemplo, células T HEK293). Por lo tanto, sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que la eliminación del sitio de ubiquitinación K86 mediante la sustitución de aminoácidos mejora la estabilidad de IL-15 (Ver Ejemplos 2 y 3).

En determinadas modalidades, la IL-15 es una variante de IL-15 que tiene una sustitución de aminoácido en la posición N112. La posición de aminoácido N112 es un sitio clave para la bioactividad de IL-15, ya que es fundamental para una interacción IL-15/receptor gamma de IL-15 adecuada, particularmente cuando la IL-15 está unida a un ABD. Por lo tanto, sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que las mutaciones en la posición N112 pueden mejorar una o más funciones de la IL-15 que incluyen, pero no se limitan a, promover la proliferación de células T en entornos tumorales, mejorar la supervivencia de las células T CD8+ y promover el desarrollo de células NK.

Las sustituciones de aminoácidos particulares que pueden mejorar la estabilidad y/o actividad biológica *in vivo* de la IL-15 incluyen, pero no se limitan a: K86A, K86R, N112A, N112S, N112Q, K86A/N112A, K86R/N112A, K86A/N112S, K86R/N112S, K86A/N112Q, K86R/N112Q, K86A/N112A/N79A, K86R/N112A/N79A, K86A/N112A/N79D, K86R/N112A/N79D, K86A/N112A/N79Q, K86R/N112A/N79Q, K86A/N112A/N71D, K86R/N112A/N71D, K86A/N112A/N71Q, K86R/N112A/N71Q, K86A/N112A/N71D/N79A, K86R/N112A/N71D/N79D, K86A/N112A/N71Q/N79A, K86R/N112A/N71Q/N79D, K86R/N112A/N71D/N79A, K86R/N112A/N71D/N79D, K86R/N112A/N71D/N79Q, K86R/N112A/N71Q/N79A, K86R/N112A/N71Q/N79D y K86R/N112A/N71Q/N79Q. Variantes ilustrativas de IL-15 que incluyen una o más de tales sustituciones de aminoácidos se representan en la Figura 3. En una modalidad ilustrativa, la variante de IL-15 incluye las sustituciones de aminoácidos K86A y N112A.

En una modalidad, la IL-15 descrita en la presente descripción (IL-15 de tipo silvestre y variantes) se une a IL-15R alfa. Tal IL-15 presentada en *trans* con su receptor ha demostrado tener una semivida prolongada y una potencia más alta en comparación con la IL-15 nativa sola. Ver, por ejemplo, Wu, J Mol Genet Med 7, 85 (2013).

D. IL-12

En otro aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones que incluyen IL-12. Como se usa en la presente, "interleucina 12", "IL-12" e "IL12" se refieren todos a una interleucina que es una citocina heterodimérica codificada por los genes IL-12A e IL-12B (números de acceso de Genbank: NM_000882 (IL-12A) y NM_002187 (IL-12B)). La IL-12 está compuesta por un conjunto de cuatro hélices alfa y está involucrada en la diferenciación de células T nativas en células TH1. La IL-12 se une al receptor de IL-12, que es un receptor heterodimérico formado por IL-12R- β 1 e IL-12R- β 2. La IL-12 se conoce como un factor estimulante de células T que puede estimular el crecimiento y la función de las células T. En particular, la IL-12 puede estimular la producción de interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) a partir de células T y células asesinas naturales (NK) y reducir la supresión de IFN- γ mediada por IL-4. La IL-12 puede mediar además la mejora de la actividad citotóxica de las células NK y los linfocitos T citotóxicos CD8+. Además, la IL-12 también puede tener actividad antiangiogénica al aumentar la producción de interferón gamma, que a su vez aumenta la producción de la proteína -10 inducible por quimiocinas (IP-10 o CXCL10). IP-10 media este efecto antiangiogénico. Sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que la IL-12 a través de su capacidad para inducir respuestas inmunitarias y su actividad antiangiogénica puede usarse para tratar cánceres.

En algunas modalidades, la IL-12 es una IL-12 de ratón. En otras modalidades, la IL-12 es una IL-12 humana.

En determinadas modalidades, la IL-12 es un polipéptido IL-12 de cadena simple que comprende una subunidad p35 de IL-12 unida a una subunidad p40 de IL-12. Tales polipéptidos IL-12 de cadena simple retienen ventajosamente una o más de las actividades biológicas de la IL-12 de tipo silvestre. En algunas modalidades, el polipéptido IL-12 de cadena simple descrito en la presente descripción es de acuerdo con la fórmula, del extremo N-terminal al extremo C-terminal, (p40)-(L)-(p35), en donde "p40" es una subunidad p40 de IL-12, "p35" es una subunidad p35 de IL-12 y L es un enlazador. En otras modalidades, la IL-12 de cadena simple es de acuerdo con la fórmula del extremo N-

terminal al extremo C-terminal, (p35)-(L)-(p40). Puede usarse cualquier enlazador adecuado en el polipéptido de IL-12 de cadena simple que incluye los descritos en la presente descripción y descritos en la Figura 49C. Los enlazadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, enlazadores que tienen la secuencia de aminoácidos (GGGS)_x en donde x es un número entero de 1-10. Otros enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos GGGGGGS. Los enlazadores de cadena simple ilustrativos de IL-12 que pueden usarse con los polipéptidos de cadena simple de IL-12 objeto también se describen en Lieschke y otros, Nature Biotechnology 15: 35-40 (1997) particularmente por su enseñanza de enlazadores de polipéptidos de IL-12.

En una modalidad ilustrativa, el polipéptido de cadena simple de IL-12 es un polipéptido de cadena simple de IL-12 humana (es decir, incluye una subunidad p35 y p40 de IL-12 humana). En determinadas modalidades, el polipéptido de cadena simple de IL-12 es un polipéptido de cadena simple de IL-12 de ratón. Cadenas simples ilustrativas de IL-12 humanas y de ratón se representan en las Figuras 20 (mostrada como péptido de fusión con ABD) y 49C.

E. Proteínas de fusión de ABD

En un aspecto, en la presente descripción se proporcionan composiciones de ABD que incluyen un dominio de unión a albúmina unido a una o más parejas de fusión (por ejemplo, una primera pareja de fusión, una segunda pareja de fusión, etc.) a través de un enlazador. Como se analiza en la presente descripción, las proteínas de fusión de ABD objeto son capaces de reciclarse endosomalmente mediado por FcRn y, por lo tanto, exhiben ventajosamente una semivida prolongada en comparación con las contrapartes que no incluyen tales ABD.

Los ABD útiles para tales proteínas de fusión de ABD incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la presente descripción. Las secuencias de aminoácidos de tales ABD, que incluyen vhCDR1-3, vICDR1-3, secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable, se describen, por ejemplo, en la Figura 2. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD incluye una cadena pesada variable que incluye las vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de cualquiera de las cadenas pesadas variables de ABD de la Figura 2, y una cadena ligera variable que incluye las vICDR1, vICDR2 y vICDR3 de cualquiera de las cadenas ligeras variables de ABD de la Figura 2. En determinadas modalidades, el ABD incluye una cadena pesada variable que tiene una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un ABD descrito en la Figura 2 y una cadena ligera variable que tiene una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de un ABD descrito en la Figura 2. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD incluye la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de un ABD descrito en la Figura 2.

En una modalidad ilustrativa, la proteína de fusión de ABD incluye una cadena pesada variable que incluye vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de la cadena pesada variable de A10m3, y una cadena ligera variable que incluye vICDR1, vICDR2 y vICDR3 de la cadena ligera variable de A10m3 (Figura 2D). En determinadas modalidades, el ABD incluye una cadena pesada variable que tiene una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de A10m3 y una cadena ligera variable que tiene una vhCDR1, una vhCDR2 y una vhCDR3 de A10m3 (Figura 2D). En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD incluye la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de A10m3 (Figura 2D).

Las proteínas de fusión descritas en la presente descripción incluyen una pareja de fusión. En algunas modalidades, la pareja de fusión incluye dos parejas de fusión (una primera pareja de fusión (FP1) y una segunda pareja de fusión (FP2)). En modalidades que incluyen dos parejas de fusión, las parejas de fusión pueden unirse al ABD en varias orientaciones. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD es de acuerdo con la fórmula, del extremo N-terminal al extremo C-terminal: FP1-ABD-FP2, FP1-PF2-ABD o ABD-FP1-FP2, en donde FP1 es una primera pareja de fusión y FP2 es una segunda pareja de fusión.

Cualquier pareja de fusión adecuada en donde se desee la extensión de la semivida de la pareja de fusión, puede incluirse en las proteínas de fusión de ABD del sujeto. Las parejas de fusión pueden incluir, por ejemplo, citocinas (por ejemplo, interferones e interleucinas), factores de crecimiento, polipéptidos, proteínas y hormonas (por ejemplo, hormonas del crecimiento, hormona paratiroidea).

En determinadas modalidades, la pareja de fusión es un resto de unión a base de anticuerpo que incluye una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Tales restos de unión pueden unirse a cualquier diana de interés, que incluye, por ejemplo, dianas específicas de tumores o citocinas. En una modalidad ilustrativa, la pareja de fusión es un fragmento variable de cadena simple (scFv). Las parejas de fusión basadas en anticuerpos también incluyen, pero no se limitan a, ds-scFv, anticuerpos de dominio único (sdAb), diacuerpos, dsFv, ds-scFv, Fab y anticuerpos de longitud completa. Las parejas de fusión basadas en anticuerpos también incluyen anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) y fragmentos.

Las proteínas de fusión de ABD objeto descritas en la presente descripción utilizan enlazadores entre componentes (ABD y parejas de fusión) y dentro de los componentes. Por ejemplo, las parejas de fusión scFv utilizan enlazadores peptídicos estándar, generalmente basados en glicina y serina, para unir las cadenas pesadas y ligeras variantes para formar el scFv. Además, se utilizan enlazadores peptídicos estándar para unir ABD a parejas de fusión (por ejemplo, parejas de fusión de citocinas). Además, se usan enlazadores para unir componentes de restos particulares, por ejemplo, la subunidad p35 y p40 de IL-12 e IL-15 con IL-15R α . En algunas modalidades, el

enlazador es un enlazador (Gly4Ser)_x, donde x es 1, 2, 3, 4, 6, 7 u 8. En modalidades particulares, el ABD se conecta a las parejas de fusión mediante enlazadores (Gly4Ser)₃.

5 Como se muestra en la presente descripción, existen varios enlazadores adecuados que pueden usarse, que incluyen enlaces peptídicos tradicionales, generados mediante técnicas recombinantes. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para enlazar dos moléculas de tal manera que asuman la conformación correcta entre sí para que retengan la actividad deseada. En una modalidad, el enlazador es de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una
10 modalidad, pueden usarse enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, con de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos que encuentran uso en algunas modalidades. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina, que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n y (GGGS)_n, donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como enlazadores, es decir, pueden encontrar uso como enlazadores.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1, pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1. Los enlazadores pueden derivarse de la cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, C_κ o C_λ. Los enlazadores pueden derivarse de cadenas pesadas de inmunoglobulina de cualquier isotipo, que incluyen, por ejemplo, C_γ1, C_γ2, C_γ3, C_γ4, C_α1, C_α2, C_δ, C_ε y C_μ. Las secuencias enlazadoras también pueden derivarse de otras proteínas tales como proteínas similares a Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR), secuencias derivadas de la región bisagra y otras secuencias naturales de otras proteínas.

25 A menudo, el enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se usa en la presente, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un enlazador, significa que no más de aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 % o no más de aproximadamente 1 % de los enlazadores, en una muestra de compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco, se escinden cuando el compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco se presenta en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma).

30 Si un enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular puede determinarse, por ejemplo, mediante la incubación con plasma del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después cuantificar la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

35 En otras modalidades no mutuamente exclusivas, el enlazador promueve la internalización celular. En determinadas modalidades, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga al agente terapéutico (es decir, en el medio del resto enlazador-agente terapéutico del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en la presente descripción). En aún otras modalidades, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto al compuesto de auristatina como a las proteínas de fusión de ABD de la invención.

40 Una variedad de enlazadores ilustrativos que pueden usarse con las presentes composiciones y métodos se describen en el documento WO 2004-010957, publicación de Estados Unidos núm. 2006/0074008, publicación de Estados Unidos núm. 20050238649 y publicación de Estados Unidos núm. 2006/0024317

45 Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse con los ABD objeto como enlazadores de dominio, enlazadores de scFv, así como también componentes de unión de parejas de fusión particulares se representan además en la Figura 48.

50 En algunas modalidades, el enlazador es un "enlazador de dominios", usado para enlazar dos dominios cualesquiera como se describe en la presente descripción juntos (por ejemplo, una pareja de fusión de citocina (por ejemplo, una interleucina) y un ABD). Si bien puede usarse cualquier enlazador adecuado, muchas modalidades utilizan un polímero de glicina-serina, que incluye, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n y (GGGS)_n, donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4 a 5) así como también cualquier secuencia peptídica que permita la unión recombinante de los dos dominios con suficiente longitud y flexibilidad para permitir que cada dominio retenga su función biológica.

55 En algunas modalidades, la pareja de fusión es un scFv que incluye una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. En tales modalidades, la cadena pesada variable de ABD se une a la cadena ligera variable con un enlazador scFv,

Las proteínas de fusión de ABD ilustrativas se analizan adicionalmente más abajo.

60 1. Proteínas de fusión citocina-ABD

- En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD incluye una pareja de fusión de citocina, es decir, proteínas de fusión de citocina-dominio de unión a albúmina (citocina-ABD) (Figura 1). En algunas modalidades, la proteína de fusión citocina-ABD incluye una IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, GM-CSF o IFN- α . Las proteínas de fusión de citocinas-ABD objeto son útiles para efectos inmunomoduladores en un sujeto donde se necesitan tales efectos inmunomoduladores (por ejemplo, tratamiento de un cáncer o una enfermedad autoinmune). Además, las citocinas-ABD objeto exhiben una semivida más larga y propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con los productos terapéuticos de interleucinas solas.
- Puede usarse cualquier ABD con las proteínas de fusión citocina-ABD descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, el ABD incluye una cadena pesada variable de ABD. En determinadas modalidades, el ABD incluye una cadena ligera variable de ABD. En modalidades ilustrativas, el ABD es un scFv que incluye una cadena pesada variable unida a una cadena ligera variable mediante un enlazador (por ejemplo, cualquiera de los enlazadores descritos en la presente descripción y en la Figura 48).
- En determinadas modalidades, la cadena pesada variable incluye la vhCDR1-3 de cualquiera de las cadenas pesadas variables de ABD descritas en la presente descripción, incluidas las cadenas pesadas variables de ABD representadas en la Figura 2. En determinadas modalidades, la cadena pesada variable de ABD incluye la vhCDR1-3 de la cadena pesada variable A10m3 (Figura 2D). En algunas modalidades, la cadena pesada variable de ABD incluye la vhCDR1-3 de A10m3 como se representa en la Figura 2D. En modalidades ilustrativas, la cadena pesada variable de ABD tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de A10m3.
- En determinadas modalidades, el ABD incluye una cadena ligera variable de ABD. En algunas modalidades, la cadena ligera variable de ABD incluye la vICDR1-3 de cualquiera de las cadenas ligeras variables de ABD descritas en la presente descripción, incluidas aquellas cadenas ligeras variables de ABD representadas en la Figura 2. En determinadas modalidades, la cadena ligera variable de ABD incluye la vICDR1-3 de la cadena ligera variable de A10m3 (Figura 2D). En algunas modalidades, la cadena ligera variable de ABD incluye la vICDR1-3 de A10m3 como se representa en la Figura 2D. En modalidades ilustrativas, la cadena ligera variable de ABD tiene la secuencia de cadena ligera variable de A10m3.
- Las secuencias de aminoácidos de citocinas ilustrativas que pueden usarse en las fusiones citocina-ABD objeto, así como también las proteínas de fusión citocina-ABD ilustrativas, donde el ABD es A10m3 se representan en la Figura 49A-G.
- En algunas modalidades, la IL-ABD es de acuerdo con la fórmula, del extremo N-terminal al extremo C-terminal, citocina-L-ABD o ABD-L-citocina, donde L es un enlazador que une la citocina al ABD (por ejemplo, un enlazador peptídico). En determinadas modalidades, la citocina -ABD incluye una cadena pesada variable y la citocina se une al N-terminal de la cadena pesada variable de ABD. En algunas modalidades, la citocina se une al C-terminal de la cadena pesada variable de ABD. En una modalidad ilustrativa, la interleucina-ABD incluye un ABD que también incluye una cadena ligera variable (por ejemplo, un scFv ABD). En algunas modalidades, la citocina se une al C-terminal de la cadena ligera variable. En determinada modalidad, el N-terminal de la citocina se une al ABD. En otras modalidades, el C-terminal de la citocina se une al ABD.
- En determinadas modalidades, la citocina es una citocina seleccionada de IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, GM-CSF e IFN- α . Las moléculas de citocina incluyen, por ejemplo, citocina de longitud completa y fragmentos de citocina, por ejemplo, una parte que es importante para la función particular de la citocina (por ejemplo, una parte de la interleucina que se une a su receptor).
- En algunas modalidades, la citocina-ABD incluye una molécula IL-2 o fragmento de esta. Como se usa en la presente, "interleucina 2", "IL-2," y "IL2" se refieren a un miembro de la citocina que tiene cuatro conjuntos de hélices alfa y señales a través del receptor de IL-2 (números de acceso de Genbank: NM_000586 y NT_000577 (humano) y NM_008366 y NP_032392 (ratón)). La IL-2 desempeña un papel clave en la función, la tolerancia y la inmunidad del sistema inmunitario, principalmente a través de sus efectos directos sobre las células T. En el timo, la IL-2 previene las enfermedades autoinmunitarias al promover la diferenciación de determinadas células T inmaduras en células T reguladoras, que destruyen otras células T que están sensibilizadas para atacar a las células normales y sanas del cuerpo. La IL-2 se ha usado para el tratamiento de cánceres (melanoma maligno, cáncer de células renales) en dosis intermitentes grandes y se ha usado ampliamente en dosis continuas. IL-2-ABD ilustrativas se muestran en la Figura 49A.
- En algunas modalidades, la proteína de fusión citocina-ABD incluye una molécula de IL-7 o fragmento de esta. Como se usa en la presente, "interleucina 7" "IL-7" e "IL7" (números de acceso de Genbank: NM_000880 y NP_000871 (humano); y NM_008371 y NP_032397 (ratón)) se refieren todos a un miembro de una citocina que es un factor de crecimiento hematopoyético secretado por células estromales en la médula ósea y el timo y se une al receptor de IL-7. La interleucina-7 (IL-7) es una citocina derivada de células no hematopoyéticas con un papel central en el sistema inmunitario adaptativo. Promueve el desarrollo de linfocitos en el timo y mantiene la supervivencia de la homeostasis de las células T vírgenes y de memoria en la periferia. Además, es importante para la organogénesis de los ganglios linfáticos (GL) y para el mantenimiento de las células T activadas reclutadas en los

órganos linfoides secundarios (SLO). La IL-7 es una solución ideal para la reconstitución inmunitaria de pacientes con cáncer inmunodeprimidos mediante la promoción de la expansión de células T periféricas. En modelos animales, la IL-7 ha demostrado prolongar la supervivencia de los huéspedes portadores de tumores. IL-7-ABD ilustrativas se muestran en la Figura 49B.

5 En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye una molécula IL-12 o fragmento de esta. En algunas modalidades, la IL-12 es una IL-12 de cadena simple como se describe en la presente descripción y como se representa en las Figuras 20 (mostrada como un péptido de fusión con ABD) y 49C.

10 En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye una molécula de IL-15 o fragmento de esta. En algunas modalidades, la IL-15-ABD incluye una variante de IL-15 como se describe en la presente descripción y en las Figuras 3 y 4. En algunas modalidades, la IL-15 es una IL-15 de tipo silvestre, como se muestra en la Figura 3 (por ejemplo, "IL-15 parental"). En determinadas modalidades, la IL-15 se une a un receptor alfa de IL-15 (IL-15R α).

15 En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye una molécula de IL-21 o fragmento de esta. Como se usa en la presente, "interleucina 21" "IL-21" e "IL21" (números de acceso de Genbank: NM_001207006 y NP_001193935 (humano); y NM_0001291041 y NP_001277970 (ratón)) se refieren todos a un miembro de una citocina que se une al receptor de IL-21 y tiene potentes efectos reguladores sobre las células del sistema inmunitario, que incluyen las células asesinas naturales (NK) y las células citotóxicas y se une al receptor de IL-21 que puede destruir células cancerosas o infectadas viralmente. Por lo tanto, sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que las citocina-ABD objeto que tienen una IL-21 son útiles para el tratamiento de varios cánceres. Las IL-21-ABD ilustrativas se muestran en la Figura 49E.

25 Otras citocinas útiles que pueden incluirse en las citocinas-ABD objeto incluyen, pero no se limitan a, IL-27, IFN- α y GM-CSF. En determinadas modalidades, el polipéptido de interleucina-ABD también incluye una molécula de interferón-alfa, interferón-beta o GM-CSF. Tales moléculas son útiles para el suministro en tumores y la reducción de la toxicidad.

30 En algunas modalidades, la citocina-ABD incluye dos citocinas unidas a un ABD seleccionado de los siguientes: IL-2 y IL-12; IL-7 e IL-15; IL-15 e IL-12; IL-18 y GMC SF; IL-21 e IL-15; GMC-SF e IL-12; GMC-SF e IL-21; e IFN- α e IL-15. La Figura 1 representa varias orientaciones ilustrativas en las que dos citocinas pueden unirse al ABD. Puede usarse cualquier ABD en dicha proteína de fusión, incluidos aquellos que incluyen cualquiera de los dominios pesados variables y dominios ligeros variables de ABD mostrados en la Figura 2. En algunas modalidades, el ABD es A10m3.

35 Puede usarse cualquier enlazador para unir cada citocina al ABD, que incluye cualquier enlazador representado en la Figura 48. Una secuencia de enlazador de cadena principal-A10m3-enlazador ilustrativa para su uso en tales proteínas de fusión se representa en la Figura 50. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse incluyen enlazadores (GGGGS)_x, en donde X es 1-10. En determinadas modalidades, se usa un (GGGGS)₅ para unir la citocina al ABD.

45 En algunas modalidades, la citocina-ABD es de acuerdo con una fórmula seleccionada de la siguiente: (del extremo N-terminal al extremo C-terminal): Citocina 1-L1-ABD-L2-Citocina 2; Citocina 1-L1-Citocina 2-L2-ABD; y ABD-L1-Citocina 1-L2- Citocina 2, donde L1 y L2 son enlazadores que conectan las citocinas y los componentes ABD y Citocina 1 y Citocina 2 se seleccionan de los siguientes pares de citocinas: IL-2 y IL-12; IL-7 e IL-15; IL-15 e IL-12; IL-18 y GM-CSF; IL-21 e IL-15; GM-CSF e IL-12; GM-CSF e IL-21; e IFN- α e IL-15. En algunas modalidades, el ABD es A10m3 (Figura 2D).

50 En tales citocina-ABD, cualquiera de las citocinas puede ser "citocina 1" y la otra citocina puede ser "citocina 2". Por ejemplo, en una modalidad del par de citocinas IL-2 e IL-12, IL-2 es "Citocina 1" e IL-12 es "Citocina 2". En otra modalidad del par de citocinas IL-2 e IL-12 par de citocinas, IL-12 es "Citocina 1" e IL-2 es "Citocina 2".

55 En algunas modalidades, la citocina-ABD incluye dos de las mismas interleucinas. En otras modalidades, el polipéptido interleucina-ABD incluye dos interleucinas diferentes (por ejemplo, una IL-12 y una IL-15), como se describió anteriormente. Las proteínas de fusión de ABD que incluyen combinaciones de citocinas particulares se describen en la Figura 51. Las proteínas de fusión de citocina-ABD ilustrativas que incluyen una combinación de diferentes citocinas se analizan más abajo en detalle.

a. IL-12 e IL-15

60 En determinadas modalidades, la proteína de fusión citocina-ABD incluye una IL-12 y una IL-15. Las secuencias de IL-12 e IL-15 ilustrativas que pueden incluirse en tales modalidades se representan en las Figuras 3 y 49C. Se cree que las citocina-ABD que incluyen tanto una pareja de fusión con IL-12 como con IL-15, exhiben los efectos antitumorales de ambas interleucinas. La combinación de IL-12 e IL-15 demostró inducir una actividad antitumoral mejorada en comparación con cualquiera de las citocinas solas. Tal actividad antitumoral mejorada se correlacionó con la regulación positiva recíproca de los receptores de cada citocina a través de la inducción sinérgica de IFN- γ .

Se demostró además que la IL-12 en combinación con IL-15 promueve la actividad antitumoral en macrófagos peritoneales a través de la síntesis de óxido nítrico. Sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que los polipéptidos que tienen tanto una pareja de fusión con IL-12 como con IL-15 son capaces de activar rápidamente la respuesta innata (IL-12) así como también estimular poderosamente la proliferación de células T y mantener las células T CD8+ de memoria (IL-15). Los estudios en animales muestran que el suministro secuencial de células que expresan IL-12 e IL-15 también curaron ratones en un entorno terapéutico de tumor establecido. El agotamiento de las células CD8+ eliminó la protección de esta terapia, lo que sugiere la expansión clonal de los CTL tumorales. *Ver*, por ejemplo, Croce y otros, Clin Cancer Res 11(2 Pt 1):735-742 (2005).

En algunas modalidades, la citocina-ABD es de acuerdo con la fórmula, del extremo N-terminal al extremo C-terminal:

- a) (IL-12)-L1-(ABD)-L2-(IL-15); o
- b) (IL-15)-L1-(ABD)-L2-(IL-12).

Puede usarse cualquier ABD adecuado que incluye, por ejemplo, un ABD que tiene una cadena pesada variable de ABD que incluye la vhCDR1-3 de cualquiera de las cadenas pesadas variables de ABD enumeradas en la Figura 2. En una modalidad ilustrativa, la cadena pesada variable incluye la vhCDR1-3 de una cadena pesada variable de A10m3 (Figura 2D). En determinadas modalidades, el ABD incluye una cadena ligera variable de ABD que incluye la vlCDR1-3 de una cadena ligera variable de A10m3. En una modalidad ilustrativa, el ABD es un scFv A10m3.

Puede usarse cualquier IL-12 e IL-15 adecuada. En algunas modalidades, la IL-15 es una variante de IL-15 como se describe en la presente descripción (*ver*, por ejemplo, Figura 3). La IL-15 también puede ser una IL-15 de tipo silvestre o una IL-15 de tipo silvestre que está unida a un IL-15R α . En una modalidad, la IL-15 es una variante de IL-15 seleccionada de las representadas en la Figura 3. En una modalidad ilustrativa, la IL-15 es una variante de IL-15 que tienen sustituciones de aminoácidos K86R y N112A.

Las IL-12 que pueden usarse incluyen las IL-12 que tienen un dominio p35 y p40. En algunas modalidades, la IL-12 es una IL-12 de cadena simple como se describe en la presente descripción (*ver*, por ejemplo, la Figura 20, como se muestra como parte de un polipéptido de fusión IL-12-ABD y Figura 49C).

En tales modalidades, L1 y L2 son un primer y segundo enlazador, respectivamente, L1 y L2 pueden ser cualquier enlazador que sea adecuado para unir los dominios IL-15 e IL-12 al dominio ABD (por ejemplo, los enlazadores enumerados en la Figura 48). Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse incluyen enlazadores (GGGGS)_x, en donde X es 1-10. En determinadas modalidades, L1 y L2 son cada uno (GGGGS)₅.

Secuencias de polipéptidos ABD ilustrativos que incluyen una IL-12 y una IL-15 se muestran en las Figuras 34 y 36.

b. IL-2 e IL-12

En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye una IL-2 y una IL-12.

IL-2 y IL-12 regulan positivamente mutuamente de forma recíproca los receptores y usan vías de señalización separadas para inducir efectos biológicos diferentes pero complementarios. Tanto IL-2 como IL-12 puede estimular a los mitógenos o a las células T activadas por CD3 a proliferar y producir IFN- γ . Además, los estudios muestran que el suministro de ambos genes de IL-2 e IL-12 en ratones portadores de melanoma B16 provocaron una reducción significativa en la carga tumoral y una mejora en la supervivencia general (*ver*, por ejemplo, Dietrich y otros, Arch Surg 387(34):177-182 (2002)). Por lo tanto, se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que tienen tanto una IL-2 como una IL-12 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

c. IL-2 e IL-15

En determinadas modalidades, la proteína de fusión citocina-ABD incluye una IL-2 y una IL-15. Tanto IL-2 como IL-15 son capaces de estimular la proliferación de células NK y células T activadas, así como también de apoyar la expansión de células T efectoras. Se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que incluyen tanto una IL-2 como IL-15 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

d. IL-7 e IL-12

En determinadas modalidades, la proteína de fusión citocina-ABD incluye una IL-7 y una pareja de fusión IL-12.

La interleucina-7 (IL-7) es una citocina derivada de células no hematopoyéticas con un papel central en el sistema inmunitario adaptativo. Promueve el desarrollo de linfocitos en el timo y mantiene la supervivencia de la homeostasis de las células T vírgenes y de memoria en la periferia. Además, es importante para la organogénesis de los ganglios linfáticos (LN) y para el mantenimiento de las células T activadas reclutadas en los órganos linfoides secundarios (SLO). La capacidad inmunitaria de los pacientes con cáncer se suprime y se caracteriza por recuentos de células T

más bajos, menor infiltración de células inmunitarias efectoras, niveles más altos de células efectoras agotadas y niveles más altos de citocinas inmunosupresoras, tales como factor de crecimiento transformante β (TGF- β). La IL-7 es una solución ideal para la reconstitución inmunitaria de pacientes con cáncer inmunodeprimidos mediante la promoción de la expansión de células T periféricas. En modelos animales, la IL-7 ha demostrado prolongar la supervivencia de los huéspedes portadores de tumores. *Ver* Gao y otros, *Int. J. Mol. Sci.* 16: 10267-10280 (2015).

La IL-12 actúa directamente sobre las células T CD8+ para potenciar su proliferación mediada por IL-7. Se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que incluyen un dominio de unión a IL-7 e IL-12 promueven ventajosamente la proliferación de células T CD8+ y mejoran la actividad citolítica contra los tumores.

e. IL-7 e IL-15

En determinadas modalidades, la proteína de fusión citocina-ABD incluye una IL-7 y una IL-15. Como se mencionó anteriormente, la interleucina 7 y la 15 se consideran citocinas proinflamatorias que tienen la capacidad de reducir la tumorigénesis. Se cree que las proteínas de fusión citocinas ABD que incluyen tanto una IL-7 como IL-15 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

f. IL-12 e IL-21

En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye una IL-12 y una IL-21.

Como se mencionó anteriormente, la IL-12 es capaz de estimular la proliferación de células NK y células T activadas y de soportar la expansión de células T efectoras. La IL-21 es un regulador de la función de las células NK y T que une los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. La IL-21 promueve la maduración de las células NK a partir de progenitores de médula ósea, activa las células NK periféricas humanas, promueve la expansión y maduración de NK y mejora las funciones efectoras mediadas por células T CD8+.

Se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que incluyen tanto una IL-12 como IL-21 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

g. IL-12 e IL-18

En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye una IL-12 y una IL-18.

Se conoce que la IL-18 induce la producción de IFN- γ , promueve el desarrollo de células Th1 y la activación de NK. Se conoce que la IL-12 induce la regulación positiva del receptor de IL-18 de una manera dependiente de IFN- γ . La administración de células de carcinoma mamario murino de SCK que coexpresan IL-18 e IL-12 a los ratones redujeron la carga tumoral e inhibieron la angiogénesis (*Ver*, por ejemplo, Coughlin y otros, *J Clin Invest* 101 (6):1441-1452 (1998)). La IL-18 en combinación con IL-12 a ratones portadores de tumores indujeron sinérgicamente un nivel sérico prolongado de IFN- γ , mientras que los ratones portadores de tumores tratados con IL-18 o IL-12 solas indujo un IFN- γ sérico mínimo que se atenuó rápidamente (*Ver*, por ejemplo, Subleski y otros, *Cancer Res* 66(22):11005-11012 (2006)). Las IL-18-ABD ilustrativas se muestran en la Figura 37.

Se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que incluyen tanto una pareja de fusión IL-12 e IL-18 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

h. GM-CSF e IL-12

En determinadas modalidades, la citocina-ABD incluye un GM-CSF y una IL-12. El GM-CSF regula la diferenciación y proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas. El GM-CSF también mejora la capacidad de las APC para procesar y presentar antígeno, lo que a su vez conduce a la activación de las células T citotóxicas, el aumento de la producción de IFN- γ y, en última instancia, la regresión tumoral. Tanto GM-CSF como IL-12 son capaces de provocar respuestas antitumorales significativas en varios modelos de tumor preclínicos diferentes, que incluyen un modelo de tumor hepático y un modelo de tumor pulmonar. (*Ver*, por ejemplo, Kilinc y otros, *J Immunol* 177(10):6962-6973 (2006)).

Se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que incluyen tanto un GM-CSF como una IL-12 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

i. IFN alfa e IL-12

La naturaleza cooperativa de estas dos citocinas se extiende más allá de meros efectos biológicos similares. Por ejemplo, la IL-12, que se conoce bien por inducir la producción de IFN- γ , puede conducir a la producción de factores solubles adicionales que mejoran la señalización de IFN- α . Se conoce que los interferones, que incluyen el interferón alfa, inducen la apoptosis en células malignas. *Ver*, por ejemplo, Thyrell, L. y otros, *Oncogene* 21, 1251-1262 (2002).

Se cree que las proteínas de fusión citocina-ABD que incluyen tanto un IFN alfa como IL-12 son útiles para la reducción de tumores y el tratamiento de cánceres.

5 Las combinaciones de citocina-citocina adicionales que pueden incluirse en las proteínas de fusión citocina-ABD objeto se representan en la Figura 51A.

2. Proteínas de fusión restos de unión-ABD

10 En algunas modalidades, las proteínas de fusión de ABD incluyen un resto de unión (por ejemplo, un pareja de fusión scFv), es decir, una proteína de fusión BM-ABD. En algunas modalidades, la BM-ABD incluye un resto de unión. En determinadas modalidades, la BM-ABD incluye dos restos de unión (por ejemplo, scFv). En otras modalidades, la BM-ABD incluye una citocina y un resto de unión (Figura 1B). La Figura 1 representa varias orientaciones ilustrativas en las que el resto de unión o combinaciones resto de unión-citocina/resto de unión-resto de unión pueden unirse al ABD.

15 Restos de unión que son útiles para la práctica con los restos de unión BM-ABD objeto que se basan en el dominio pesado variable y el dominio ligero variable de anticuerpo. En algunas modalidades, el resto de unión incluye un dominio pesado variable y un dominio ligero variable. En algunas modalidades, el resto de unión es un fragmento variable de cadena simple (scFv).

20 Puede usarse cualquier ABD en dicha proteína de fusión, incluidos aquellos que incluyen cualquiera de los dominios pesados variables y dominios ligeros variables de ABD mostrados en la Figura 2. En determinadas modalidades, el ABD incluye los dominios pesados y ligeros variables de A10m3. En algunas modalidades, el ABD es scFv A10m3.

25 Puede usarse cualquier enlazador para unir la citocina y/o el resto de unión al ABD, que incluye cualquier enlazador representado en la Figura 48. En una modalidad ilustrativa, el enlazador es (GGGGS)₅. Una secuencia de enlazador de cadena principal-A10m3-enlazador ilustrativa para su uso en tales proteínas de fusión se representa en la Figura 48.

30 Combinaciones ilustrativas de dos restos de unión (por ejemplo, scFv) o una citocina y un resto de unión que puede ser tales proteínas de fusión de ABD se representan en la Figura 51B.

35 En algunas modalidades, la BM-ABD incluye un dominio de unión a anti-TGFβ (por ejemplo, un scFv anti-TGFβ). Las secuencias de scFv anti-TGFβ ilustrativas se representan en la Figura 45. En algunas modalidades, el scFv anti-TGFβ incluye el dominio pesado variable y el dominio ligero variable del scFv anti-TGFβ 4D9. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD incluye un scFv anti-TGFβ y una citocina o resto de unión adicional, donde la citocina o resto de unión adicional es un segundo scFv anti-TGFβ, IL-15, IL-12, o un dominio de unión a anti-PD-L1 (10D12). Ver la Figura 51B.

40 En algunas modalidades, la BM-ABD incluye un dominio de unión anti-PD-L1 (por ejemplo, un scFv anti-T PD-L1). En algunas modalidades, el scFv anti-PD-L1 incluye el dominio pesado variable y el dominio ligero variable de 4D9 anti-PD-L1 10D12 scFv. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ABD incluye un scFv - PD-L1 y una citocina o resto de unión adicional, donde la citocina o resto de unión adicional es un segundo scFv anti-anti-PD-L1, IL-15, IL-12, o un anti-dominio de unión a TGFβ (4D9). Ver la Figura 51B.

45 a. Restos de unión a TGF-β

50 En determinadas modalidades, la BM-ABD proporcionada en la presente descripción incluye un resto de unión a TGF-β. Como se usa en la presente, "TGF-β", "TGFβ", "TGFb" y "factor de crecimiento transformante beta" se refieren a todos a un miembro de una familia de citocinas que están involucradas en el control de la proliferación, la diferenciación celular y otras funciones en la mayoría de las células y existen en al menos tres isoformas: TGFβ1 (números de acceso de Genbank: NM_000660 y NP_000651 (humano); y NM_011577 y NP_035707 (ratón)), TGFβ2 (números de acceso de Genbank NM_001135599 y NP_001129071 (humano)) y NM_009367 y NP_33393 (ratón)) y TGFβ3 (número de acceso de Genbank: NM_003239). Los miembros de la familia TGFβ tienen un péptido señal N-terminal de 20-30 aminoácidos que se requieren para la secreción de las células, una región pro, y una región C-terminal de 112-113 aminoácidos que se convierte en la molécula de TGFβ madura después de su liberación de la región pro mediante escisión proteolítica. En determinadas modalidades, la proteína TGFβ madura puede dimerizarse para producir una molécula activa de 25kDa con muchos motivos estructurales conservados, que incluyen nueve residuos de cisteína, ocho de los cuales forman enlaces disulfuro dentro de la molécula TGFβ para crear una estructura de nudo de cisteína. La novena cisteína conservada forma un enlace con la novena cisteína de otro TGFβ para producir el dímero.

65 Sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que la BM-ABD objeto que se une a TGFβ puede usarse para tratar a sujetos que tienen cánceres (por ejemplo, un cáncer de etapa tardía). En determinadas modalidades, la BM-ABD incluye un resto de unión a TGFβ1. En determinadas modalidades, la BM-ABD incluye un resto de unión a TGFβ2. En determinadas modalidades, la BM-ABD incluye un resto de unión a TGFβ3. En algunas

modalidades, el polipéptido de unión multivalente incluye un resto de unión que puede unirse a TGFβ1, TGFβ2 y/o TGFβ3 o cualquiera de sus combinaciones (por ejemplo, se une a TGFβ1 y TGFβ2; se une a TGFβ2 y TGFβ3; se une a TGFβ1 y TGFβ3; o se une a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3). En algunas modalidades, el resto de unión a TGFβ se une a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3. En algunas modalidades, el resto de unión a TGFβ que incluye el dominio pesado variable y el dominio ligero variable de un resto de unión a TGFβ en la Figura 40. En una modalidad, el resto de unión a TGFβ incluye el dominio pesado variable y el dominio ligero variable del resto de unión a TGFβ 4D9 (Figura 40B). En una modalidad particular, el resto de unión a TGFβ es el scFv 4D9. Se ha demostrado que 4D9 previene la expansión de células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺, previenen la activación de Smad (por ejemplo, fosforilación de Smad2), así como también previenen la transición epitelial a mesenquimal celular y/o la migración de células cancerosas.

En algunas modalidades, la proteína de fusión resto de unión a TGFβ-ABD se une además a otro resto de unión o citocina. En determinadas modalidades, el otro resto de unión es un resto de unión a PD-L1 u otro resto de unión a TGFβ. En algunas modalidades, la citocina es IL-15 o IL-12 (Ver Figura 51B).

b. Restos de unión a PD-L1

En determinadas modalidades, la BM-ABD proporcionada en la presente descripción incluye un resto de unión al ligando 1 de muerte celular programada 1 (PD-L1). Como se usa en la presente, "Ligando 1 de muerte celular programada 1", "Ligando 1 de muerte celular programada", "PDL1" y "PD-L1" (números de acceso de Genbank NM_001267706 y NP_001254635 (humano) y NM_021893 y NP_068693 (ratón)) se refieren a un miembro de una proteína transmembrana de tipo 1 de 40 kDa que se une al receptor de PD1, que se encuentra en células T activadas, células B y células mieloides, para modular la activación o inhibición. La regulación positiva de PD-L1 permite que los cánceres evadan el sistema inmunitario. Ver, por ejemplo, Hamanishi y otros, Proc Natl Acad Sci USA 104(9): 3360-5 (2007). Como tal, se cree que las ABD-BM objeto que incluyen un resto de unión a PD-L1 pueden ser útiles en el tratamiento de cánceres.

En una modalidad, el resto de unión a PD-L1 incluye el dominio pesado variable y el dominio ligero variable del resto de unión a PD-L1 10D12 (Figura 50). En una modalidad particular, el resto de unión a PD-L1 es el scFv 10D12 (Figura 50). 10D12 se une a hPD-L1 a pH bajo y tiene reacción cruzada con mPD-L1. 10D12 no se une a hPD-L2 o mPD-L2. Además, 10D12 bloquea la interacción PD-1/PD-L1, así como también la interacción B71/PD-L1.

En algunas modalidades, la proteína de fusión resto de unión a PD-L1-ABD se une además a otro resto de unión o citocina. En determinadas modalidades, el otro resto de unión es un resto de unión a TGFβ u otro resto de unión a PD-L1. En algunas modalidades, la citocina es IL-15 o IL-12 (Ver Figura 51B).

c. TNF y otros restos de unión

En una modalidad, la proteína de fusión de ABD proporcionada en la presente descripción incluye un resto de unión al factor de necrosis tumoral (TNF). Sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que tales proteínas de fusión de ABD son útiles como productos terapéuticos antiinflamatorios y/o contra el cáncer. En algunas modalidades, el resto de unión a TNF es un scFv. En modalidades particulares, la proteína de fusión resto de unión a TNF-ABD se une además a otra pareja de fusión que es un resto de unión o un péptido inhibidor. En determinadas modalidades, el segundo resto de unión es un segundo resto de unión al TNF, un resto de unión a IL-1, un resto de unión a IL-6, un resto de unión a IL-8, un resto de unión a IL-17 (isoformas A-F), o un resto de unión a IL-23.

En otra modalidad, la proteína de fusión de ABD incluye un resto de unión seleccionado de un resto de unión a IL-1, IL-6, IL-8, IL-17(A-F) e IL-23.

En algunas modalidades, tales restos de unión a TNF y a interleucina-ABD son útiles para el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, colitis ulcerativa, psoriasis en placas crónica y enfermedades basadas en TNF.

F. Usos de diagnóstico

En otro caso proporcionado en la presente descripción se describen métodos para la obtención de imágenes y/o detección de tumores. Los métodos comprenden poner en contacto una célula tumoral, cultivo de células tumorales, célula de la vasculatura tumoral, cultivo de células de la vasculatura tumoral, tejido tumoral y otros tejidos y células con una proteína de fusión de ABD objeto de la invención que está marcada.

La proteína de fusión ABD también encuentra uso en la obtención de imágenes in vitro o in vivo de tumores o estados patológicos autoinmunitarios asociados con las parejas de unión al antígeno de la proteína de fusión de ABD en la presente descripción. La proteína de fusión descrita en la presente descripción se usa tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, o solo para el diagnóstico. En algunos casos, se marca una proteína de fusión de ABD objeto.

El diagnóstico puede realizarse in vivo, mediante la administración de una proteína de diagnóstico que permite la obtención de imágenes de todo el cuerpo como se describe más abajo, o in vitro, en muestras extraídas de un paciente. "Una muestra" en este contexto incluye cualquier cantidad de cosas, que incluyen, pero sin limitarse a, fluidos corporales (que incluyen, pero sin limitarse a, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor y semen), así como también muestras de tejido tales como resultado de biopsias de tejidos relevantes.

Por "marcada" en la presente descripción se entiende que la proteína de fusión de ABD descrita en la presente descripción tiene uno o más elementos, isótopos, o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un procedimiento de cribado o diagnóstico. En general, los marcadores caen en varias clases: a) marcadores inmunitarios, que pueden ser un epítipo incorporado como un pareja de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, c) marcadores de moléculas pequeñas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permiten otros métodos de marcaje, y d) marcadores tales como partículas (que incluyen burbujas para el marcaje por ultrasonido) o marcadores paramagnéticos que permiten la obtención de imágenes del cuerpo. Los marcadores pueden incorporarse a las proteínas en cualquier posición (por ejemplo, a través de uno o más de los enlazadores descritos en la presente descripción) y pueden incorporarse in vitro o in vivo durante la expresión de proteínas, como se conoce en la técnica. Los marcadores específicos incluyen colorantes ópticos, que incluyen, pero no se limitan a, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo estos últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser fluoróforos de "molécula pequeña" o fluoróforos proteicos.

Por "marcador fluorescente" se entiende cualquier molécula que puede detectarse a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde malacita, stilbeno, luciferina amarillo, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow and R-focoeitrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, Oreg.), FITC, rodamina, y Texas Red (Pierce, Rockford, Ill.), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, Pa.). Los colorantes ópticos adecuados, incluidos los fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Los marcadores fluorescentes proteicos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente verde, que incluye una especie de Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie y otros, Science 263:802-805 (1994)), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8vo piso, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim y otros, 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki y otros, J. Immunol. 150:5408-5417 (1993)), beta galactosidasa (Nolan y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607 (1998)) y Renilla (documentos WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, patentes de Estados Unidos núms. 5,292,658, 5,418,155, 5,683,888, 5,741,668, 5,777,079, 5,804,387, 5,874,304, 5,876,995, 5,925,558).

G. Producción de dominios de unión a albúmina y proteínas de fusión

Como apreciarán los expertos en la técnica, se usan protocolos estándar para hacer los ABD objeto. Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y tamizaje de anticuerpos se describen en Antibody Engineering, editado por Kontermann y Dubel, Springer, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, Curr Opin Chem Biol 5:683-689 (2001); Maynard y Georgiou, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76 (2000).

En una modalidad descrita en la presente descripción, se crean ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión de ABD, y que después pueden clonarse en células huésped, expresarse y ensayarse, si se desea. Por lo tanto, pueden fabricarse ácidos nucleicos, y particularmente ADN, que codifican cada secuencia de proteínas. Estas prácticas se llevan a cabo mediante el uso de procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden encontrar uso en la generación de proteínas de fusión de ABD, similares a la producción de anticuerpos, se describen en la presente descripción en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ra Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001) y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons).

Existen una variedad de técnicas que pueden usarse para generar eficientemente ADN que codifican ABD descritos en la presente descripción. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de ensamble de genes, métodos basados en PCR y métodos que usan variaciones de PCR, métodos basados en reacción de cadena de ligasa, métodos de oligos agrupados tales como los usados en el barajado sintético, métodos de amplificación propensa a errores y métodos que usan oligos con mutaciones aleatorias, métodos clásicos de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de casete y otros métodos de amplificación y síntesis de genes. Como se conoce en la técnica, existen una variedad de kits y métodos disponibles comercialmente para el ensamble génico, la mutagénesis, la subclonación de vectores, y similares, y tales productos comerciales encuentran uso en la generación de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de ABD.

Los ABD descritos en la presente descripción pueden producirse mediante el cultivo de una célula huésped transformada con ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión de ABD, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y serán fácilmente determinadas por un experto en la técnica a través de la experimentación de rutina. Puede usarse una amplia variedad de células huésped apropiadas, que incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levaduras y células vegetales. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso en la generación de proteínas de fusión de ABD descritas en la presente descripción se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC®, disponible en la American Type Culture Collection.

En una modalidad, los ABD se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, que incluyen sistemas en los que los constructos de expresión se introducen en las células de mamíferos mediante el uso de virus tales como retrovirus o adenovirus. Pueden usarse cualquier célula de mamífero, por ejemplo, células humanas, de ratón, de rata, de hámster y de primates. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, NS0 y variantes de estas. En una modalidad alternativa, las proteínas de la biblioteca se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacteriana se conocen bien en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lividans*. En modalidades alternativas, las proteínas de fusión de ABD se producen en células de insectos (por ejemplo, Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). En una modalidad alternativa, los polipéptidos ABD se expresan *in vitro* mediante el uso de sistemas de traducción sin células. Los sistemas de traducción *in vitro* derivados tanto de células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) y eucariota (por ejemplo, germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y pueden elegirse en base a los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como apreciarán los expertos en la técnica, la traducción *in vitro* es necesaria para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, la presentación de ribosomas. Además, las proteínas de fusión de ABD pueden producirse mediante métodos de síntesis química. También los sistemas de expresión transgénicos tanto animales (por ejemplo, leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, larvas de insectos enteros, etc.) como plantas (por ejemplo, maíz, tabaco, lechuga de agua, etc.).

Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de ABD descritas en la presente descripción pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar la proteína. Puede usarse una variedad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula huésped. Por lo tanto, los vectores de expresión que se usan para generar anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levaduras y en sistemas *in vitro*. Como se conoce en la técnica, una variedad de vectores de expresión están disponibles, comercialmente o de cualquier otra manera, que pueden encontrar uso para expresar anticuerpos descritos en la presente descripción.

Las proteínas de fusión de ABD descritas pueden codificarse por múltiples moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras variables pueden introducirse en una célula huésped independientemente. Aunque están presentes en ácidos nucleicos separados, su expresión produce un solo polipéptido.

Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína unida operativamente con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en la presente descripción se entiende que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador de transcripción y traducción unido operativamente al ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión de ABD multivalentes, y son típicamente apropiados para la célula huésped usada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de transcripción y traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y parada de transcripción, secuencias de inicio y parada de traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión típicamente contienen un gen o marcador de selección para permitir la selección de células huésped transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

En una modalidad, los ABD se purifican o aíslan después de la expresión. Los ABD y las proteínas de fusión de ABD pueden aislarse o purificarse de varias maneras conocidas para los expertos en la técnica. La purificación puede ser particularmente útil para separar especies de cadena pesada heterodiméricas de especies de cadena pesada homodiméricas, como se describe en la presente descripción. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen intercambio iónico, interacción hidrófoba, afinidad, dimensionamiento o filtración en gel, y fase inversa, llevadas a cabo a presión atmosférica o a alta presión mediante el uso de sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas de electroforesis, enfoque isoelectrónico, inmunológico, precipitación, diálisis y cromatofocalización. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Se emplea fusión, cromatografía de afinidad de Ni+2 si

se emplea una etiqueta His, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se usa una etiqueta flag. Para guía general en técnicas de purificación adecuadas, ver, por ejemplo,

5 Protein Purification: Principles and Practice, 3ra Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará en dependencia del cribado o el uso de los anticuerpos. En algunos casos no se necesita purificación.

H. Usos terapéuticos de dominios de unión a albúmina y proteínas de fusión de ABD

10 Los ABD y proteínas de fusión de ABD objeto encuentran uso en una variedad de usos terapéuticos como se describe en la presente descripción.

15 En un caso proporcionado en la presente descripción está un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina (ABD) descritas en la presente descripción. Las proteínas de fusión de ABD útiles incluyen, pero no se limitan a, las descritas en las Figuras 4, 20, 34, 36, 40, 45, 50-51.

20 En algunos casos, la proteína de fusión de ABD incluye una IL-12 o IL-15 (por ejemplo, una proteína de fusión IL-12-ABD o IL-15-ABD). Como se describe en la presente descripción, las proteínas de fusión IL-15 ABD son capaces de inhibir el crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis. Tal inhibición del crecimiento tumoral mediada por IL-15 va acompañada de un aumento en los linfocitos infiltrantes de tumor, que incluyen los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células asesinas naturales (NK) activadas. En determinados casos, la proteína de fusión de ABD incluye una molécula IL-12. En algunos casos, la proteína de fusión de ABD incluye una IL-15. En aún otros casos, la citocina-ABD incluye una IL-12 y una IL-15. En algunos casos, la IL-15-ABD incluye una variante de IL-15 como se describe en la presente descripción (ver, por ejemplo, Figura 3).

30 También se proporciona en la presente descripción un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer mediante la administración al sujeto de una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina (ABD). En algunos casos, la proteína de fusión de ABD incluye una IL-12 o IL-15 (por ejemplo, una proteína de fusión IL-12-ABD o IL-15-ABD). IL-12 e IL-15 son citocinas para la inmunomodulación del microambiente tumoral debido a su capacidad para proliferar y extender la supervivencia de las células T CD8+. Otras proteínas de fusión de ABD útiles incluyen, pero no se limitan a, las descritas en las Figuras 4, 20, 34, 36, 40, 45, 50-51.

35 Los ejemplos de cáncer a tratar en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma, sarcoma, determinadas leucemias o neoplasias malignas linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen el cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal, incluido el cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, 40 cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneal, cáncer de piel/melanoma, así como también cáncer de cabeza y cuello y metástasis asociadas con cualquiera de los tumores primarios.

45 En otro caso proporcionado en la presente descripción, está un método para aumentar la proliferación y/o la supervivencia de una célula T CD8+. El método comprende poner en contacto la célula con una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina que incluye en IL-12 y/o IL-15 (por ejemplo, una proteína de fusión IL-12-ABD o IL-15-ABD). En determinados casos, la proteína de fusión de ABD incluye una molécula IL-12. En algunos casos, la proteína de fusión de ABD incluye una molécula IL-15. En aún otros casos, la proteína de fusión de la proteína de 50 fusión ABD incluye una IL-12 y una IL-15.

1. Formulaciones farmacéuticas, administración y dosificación

55 En otro caso proporcionado en la presente descripción está una composición terapéutica que comprende cualquier polipéptido de dominio de unión a albúmina (ABD) objeto y un portador. Las composiciones terapéuticas objeto usadas en la práctica de los métodos anteriores pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador adecuado para el método de suministro deseado. Los portadores adecuados incluyen cualquier material que cuando se combina con la composición terapéutica retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no reacciona con el sistema inmunitario del paciente. Los ejemplos 60 incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de varios portadores farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares (ver, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta Edición, A. Osal., Ed., 1980).

1. Composiciones para administración *in vivo*

65

Las formulaciones de la proteína de fusión de dominio de unión a albúmina (ABD) usadas de acuerdo con la presente descripción se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de una proteína de fusión de ABD que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; parabenos alquilo tales como parabenos de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas de fusión de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA o DPTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteínas con Zn); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG) de varios pesos moleculares.

La formulación en la presente descripción también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar proteínas de fusión de ABD con otras especificidades. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de molécula pequeña. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito previsto.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se usarán para la administración in vivo deben ser estériles, o casi. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices tienen forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de Estados Unidos núm. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D-(-)-ácido 3-hidroxi-butírico. Si bien los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

Cuando las proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina encapsuladas permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización en dependencia del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse mediante la modificación de residuos de sulfhidrilo, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, mediante el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones de matriz polimérica específicas.

2. Modalidades administrativas

Las proteínas de fusión de dominio de unión a albúmina y agentes terapéuticos objeto se administran a un sujeto, de acuerdo con los métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

3. Modalidades de tratamiento

En los métodos proporcionados en la presente descripción, la terapia se usa para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una

5 mejora de la enfermedad o afección, y/o una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células tumorales; (2) un aumento en la muerte de células tumorales; (3) inhibición de la supervivencia de células tumorales; (5) inhibición (es decir, ralentización en cierta medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral; (6) una tasa de supervivencia del paciente aumentada; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.

10 Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección dada pueden determinarse mediante criterios de respuesta estandarizados específicos para esa enfermedad o afección. La respuesta tumoral puede evaluarse para detectar cambios en la morfología del tumor (es decir, la carga tumoral general, el tamaño del tumor y similares) mediante el uso de técnicas de cribado tales como la exploración de imágenes por resonancia magnética (IRM), la exploración de imágenes radiográficas, la exploración tomográfica computarizada (TC), la exploración de imágenes óseas, la endoscopia y la obtención de muestras de biopsia tumoral, que incluye la aspiración de médula ósea (BMA) y el recuento de células tumorales en la circulación.

15 Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a la terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

20 Por lo tanto, para los tumores de células B, por ejemplo, el sujeto puede experimentar una disminución de los llamados síntomas B, es decir, sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso y/o urticaria. Para las afecciones premalignas, la terapia con un agente terapéutico multivalente puede bloquear y/o prolongar el tiempo antes del desarrollo de una afección maligna relacionada, por ejemplo, el desarrollo de mieloma múltiple en sujetos que padecen de gamopatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS).

25 Una mejora de la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende la ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anómalo, médula ósea y líquido cefalorraquídeo (LCR) o proteína monoclonal anómala en el caso de mieloma.

30 Tal respuesta puede persistir durante al menos 4 a 8 semanas, o a veces de 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con los métodos objeto. Alternativamente, una mejora de la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende al menos aproximadamente una disminución del 50 % en toda la carga tumoral medible (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto, o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, que pueden persistir de 4 a 8 semanas, o de 6 a 8 semanas.

35 El tratamiento incluye una "cantidad terapéuticamente efectiva" de los medicamentos usados. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado.

40 Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo se contrarresta con los efectos terapéuticamente beneficiosos.

45 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos.

50 Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse mediante el examen de la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o inducir la apoptosis mediante ensayos in vitro conocidos por el experto. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar de cualquier otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades en base a factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

Ejemplos

60 Ejemplo 1: Cribado e identificación de dominios de unión a albúmina sérica humana

65 Se llevaron a cabo métodos de barrido en fase sólida y de barrido en solución para identificar dominios de unión a albúmina (ABD) de scFv de fagos. Los dominios de unión a albúmina que se seleccionaron de un cribado primario para dominios de unión a albúmina sérica humana se cribaron subsecuentemente para determinar la reactividad cruzada con albúmina sérica de ratón mediante el uso de técnicas de ELISA estándar. Los candidatos de dominio de unión a albúmina primaria obtenidos mediante el uso de los métodos de cribado se secuenciaron y

subsecuentemente se analizaron para determinar la unión dependiente de la concentración diana, la estabilidad del pH, la interferencia de unión a FcRn y la unión cinética. En particular, los ABD candidatos se eligieron por su capacidad para unirse a la albúmina sérica humana (kD ~20-60 nM), albúmina sérica de ratón (kD ~10-30 nM) y albúmina sérica de cyno (kD ~20-60 nM) a pH bajo (pH 5,5) y pH neutro (pH 7,7). Se analizó a los ABD candidatos para garantizar que no compitieran con la unión de FcRn a la albúmina sérica. Como se explica en la presente descripción, los ABD que se unen a tal pH y no compiten con la unión a FcRn son capaces de experimentar el reciclaje endosomal mediado por FcRn. Por lo tanto, los productos biológicos (por ejemplo, citocinas y productos biológicos basados en anticuerpos) que incluyen tales ABD también son capaces de experimentar dicho reciclaje mediado por FcRn y, por lo tanto, exhiben una semivida más larga en comparación con las contrapartes que no incluyen tales ABD.

Se seleccionaron cinco clones de unión a albúmina en base a estos criterios: A9, A10, A6, 2B4, 2H10. De estos cinco clones, A10 se seleccionó en base a un alto nivel de expresión y el mejor perfil de actividad. A10 se mutó después para eliminar las regiones que podrían supuestamente provocar inmunogenicidad. De estas variantes de A10, se seleccionó A10m3 como la principal en base a su alta afinidad por la albúmina sérica.

Las secuencias de dominios de unión a albúmina sérica humana ilustrativas se muestran en la Figura 2, que incluye A10m3 (Figura 2D).

Ejemplo 2: Variante de IL-15 e IL-15-ABD

La expresión de la proteína IL15-A10m3 es extremadamente deficiente por las células HEK293T, lo que no puede explicarse por la transcripción

Los constructos de L-15-ABD (IL-15-A10m3) se produjeron en células HEK293 en tres cultivos celulares transfectados independientemente y se evaluaron mediante transferencia de Western mediante el uso de anticuerpo anti-etiqueta His (Figura 5A, izquierda) o mediante unión ELISA funcional a albúmina sérica de ratón (Figura 5A, derecha). Como se muestra en la Figura 5A, la expresión de IL-15-A10m3 no pudo evaluarse mediante ninguno de estos métodos. Para evaluar si la falta de expresión de IL-15-A10m3 en células HEK293 se debió a bajos niveles de transcripción, el ARNm se preparó a partir de cuatro células transfectadas con IL-15-A10m3 independientemente y se realizó RT-PCR para cuantificar el nivel de ARNm de IL15-A10m3 (Figura 5B, carriles 2-5) en comparación con el de un gen constitutivo, GAPDH (Figura 5B, carril 6). Como se muestra en la Figura 5B, se detectó ARNm de IL15-A10m3 en cantidades significativas de las células transfectadas con relación a GAPDH de control, lo que sugiere que los niveles de expresión bajos de IL-15-A10m3 producidas en células HEK293 no se debe a la transcripción, sino que es más probable que esté asociada con el proceso de traducción o postraducción.

Identificación de un sitio de ubiquitinación supuesto en IL15 que es adyacente al sitio de unión al receptor de IL15 alfa

Los estudios han demostrado que la proteína IL15 se expresó en las células pero es muy inestable con una semivida corta. La coexpresión de IL15R α con IL15 en la misma célula aumentó en gran medida la cantidad de IL15R α en la superficie celular así como también IL15. Estudios adicionales confirmaron que IL15R α actúa como un chaperona de IL15 y se une a IL15 intracelularmente para proteger y estabilizar IL15 antes de la secreción. Estos hallazgos sugieren que la traducción puede no explicar la baja productividad de IL15. Más bien, la modificación postraduccional (PTM) podría desempeñar un papel en la inestabilidad intracelular de IL15, y que la inestabilidad intracelular de IL15 puede superarse mediante IL15R α bloqueando la modificación postraduccional específica aún no conocida. La ubiquitinación es un mecanismo bien documentado que permite a las células marcar proteínas intracelulares para su degradación.

Dado que la IL15 es una citocina proinflamatoria muy potente, cuya expresión es controlada estrictamente por las células, es posible que las células utilicen la ubiquitinación para controlar activamente los niveles de proteína IL15. Se identificaron sitios de ubiquitinación potenciales en IL-15 que se protegen supuestamente tras la unión a IL-15R α (Figura 6). En particular, el aminoácido K86 es un sitio de ubiquitinación supuesto que está junto al sitio de unión IL-15/IL-15R α (Figura 6A), lo que sugiere la posibilidad de que la unión de IL15R α a IL15 bloquee la accesibilidad de la ligasa de ubiquitina (por ejemplo, E3) a K86 en la proteína IL15. K86 se confirmó además como un sitio de ubiquitinación mediante el uso de UbPred, una base de datos de sitios de ubiquitinación en línea (www.ubpred.org) Figura 6B.

La mutación de K86 en IL15 restaura la expresión de la proteína IL15-A10m3 por células HEK293T

Para evaluar si la ubiquitinación en K86 afecta la estabilidad intracelular de IL-15, se generaron variantes de IL-15 que contenían sustituciones de aminoácidos en K86, que incluían K86A y K86R. Las secuencias de varias de estas variantes de IL-15 se muestran en la Figura 3. Sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que las sustituciones de aminoácidos en estos sitios de ubiquitinación particulares conducen a IL-15 resistente a la ubiquitinación que presenta una estabilidad aumentada con respecto a la IL-15 de tipo silvestre. Tales variantes de IL-15 se unieron a un ABD (A10m3) para una extensión adicional de la semivida (Figura 4). La Figura 7 proporciona

ilustraciones esquemáticas de tales proteínas de fusión IL-15-ABD que incluyen una IL-15-ABD con una IL-15R α /IL15 "dominio sushi" (A) y proteínas de fusión IL-15-ABD que incluyen variantes de IL-15 que tienen sustituciones de aminoácidos en el sitio de ubiquitinación K86 (B).

5 Las variantes K86R y K86A de IL-15-ABD e IL-15R α /IL15-ABD producidas por células HEK293 se evaluaron por su capacidad para unirse a la albúmina sérica de ratón (MSA) e IL-15R α . Como se muestra en la Figura 8A, las variantes K86R y K86A de IL-15-ABD (12 clones) e IL-15R α /IL15-ABD (12 clones) producidas por HEK293 mostraron una mayor expresión en comparación con IL-15-ABD de tipo silvestre producidas en HEK-293 (12 clones). Tales constructos también fueron capaces de unirse a MSA. Además, como se muestra en la Figura 8B, las sustituciones K86R (clon R6, estrella verde) y K86A (clon A3, estrella amarilla) no interfirieron con la capacidad de las variantes para unirse a IL-15R α . Curiosamente, la IL15-A10m3 fusionada con IL15R α no mostró ninguna unión a IL15R α , lo que sugiere que el dominio sushi de IL15R α interno se unió a IL15 de forma intramolecular y, por lo tanto, bloqueó la unión a IL15R α externo recubierto en la placa. Esto es consistente con nuestro y otros hallazgos que indican que la unión de IL15 al dominio sushi de IL15R α aumenta la expresión de IL15 (Figura 7B).

15 Un aumento de la producción de una variante particular de IL-15-ABD producida por células HEK293 que contiene la sustitución de aminoácido K86R (IL-15 K86R-A10m3) se llevó a cabo y se evaluó la unión a la albúmina sérica del constructo IL-15 K86R-A10m3 *in vitro*. Como se muestra en la Figura 9, la IL-15-ABD que tiene una mutación K86 (IL-15 K86R-A10m3) e IL-15R α /IL15-ABD (IL-15R α /IL15-A10m3) fueron capaces de producirse en células HEK 293 en cantidades aumentadas, como se confirma por SDS-PAGE (Figura 9C, izquierda) y transferencia de Western con un anticuerpo anti-etiqueta His (derecha). Además, como se muestra en la Figura 10, K86R-A10m3 mostró unión a la albúmina sérica de ratón (MSA).

25 La bioactividad de IL15 K86R -A10m3 producida a partir de células HEK293T se ve afectada, lo que puede rescatarse mediante desglucosilación.

30 Se probó la bioactividad de varias IL-15-ABD mediante el uso de ensayos de proliferación de CTLL2. Las IL-15-ABD probadas incluyen IL-15-A10m3 y tres IL-15 K86R-A10m3s diferentes producidas en células HEK293T. IL-15 disponible comercialmente e IL-15-ABD producida internamente, ambas elaborados mediante el uso de E. coli, se usaron como controles. Como se muestra en la Figura 11, IL-15 K86R-A10m3 producida a partir de HEK293T mostró una capacidad significativamente reducida para promover la proliferación de CTLL2 en comparación con los controles producidos en E. coli, que incluyen IL-15 de tipo silvestre comercial (R&D) e IL-15-A10m3 producida internamente. Dada la diferencia en los ensayos de proliferación de CTLL2 entre IL15 K86R -A10m3 de HEK293T e IL15-A10m3 de E. coli, se planteó la hipótesis que dado que IL15-A10m3 producida a partir de E. coli no experimenta la N-glucosilación clásica como en las células de mamíferos, es posible que la glucosilación de IL15 K86R -A10 m3 en células T HEK293 puede interferir en la interacción de IL15 K86R -A10m3 con sus receptores.

40 Para evaluar si la bioactividad reducida de IL-15 K86R-A10m3 producida por células HEK se debe a la glucosilación, se desglucosiló IL-15 K86R-A10m3 mediante el uso de PNGasa y se llevaron a cabo ensayos de proliferación de CTLL2 para evaluar la bioactividad de la IL15 K86R-A10m3 desglucosilada. Después del tratamiento con mezcla de PNGasa de IL-15 K86R-A10m3 en condiciones nativas, el glucano se eliminó completamente y se visualizó mediante SDS-PAGE seguido de tinción de glucano (Figura 12A, izquierda) y tinción de azul de coomassie (Figura 12A, derecha). 1) IL-15R-A10m3+ 5 ul de mezcla de PNGasa; 2) proteína + 10 ul de mezcla de PNGasa; 3) control sin enzima. Como se muestra en la Figura 12B, la desglucosilación de IL-15 K86R-A10m3 (azul) casi rescató completamente la actividad en ensayos de proliferación de CTLL2, en comparación con muestras no tratadas (púrpura, amarillo). Se usaron IL-15 WT de R&D systems (rojo) e IL-15-A10m3 producida por E. coli internamente (negro) como controles positivos.

50 N112 de IL-15 K86R-A10m3 es fundamental para su bioactividad para promover la proliferación de CTLL2

La posición de aminoácido N112 de IL-15 K86R-A10m3 es un sitio clave para la bioactividad de IL-15, particularmente en el contexto de IL-15-ABD, ya que es fundamental para un establecimiento adecuado de la interacción entre IL-15 y receptor gamma de IL15. La variante IL-15 K86R se mutó además en N112A para determinar si las mutaciones en este sitio podrían restaurar la bioactividad de IL-15, similar a la IL-15 desglucosilada. En particular, IL15 K86R-A10m3 se mutó para incluir además una sustitución de aminoácidos N112Q, N112A o N112S de IL-15 y se llevaron a cabo ensayos de proliferación de CTLL2 para probar la bioactividad. Como se muestra en la Figura 13A, la introducción de la sustitución de aminoácido N112A en IL-15 K86R-A10m3 (azul) restauró su bioactividad comparable a la de IL-15 K86R-A10m3 desglucosilada (verde) en ensayos de proliferación de CTLL2, mientras que la mutación N112Q (rojo) no tiene efecto sobre la bioactividad con relación a la IL-15R-A10m3 parental sin desglucosilación (amarillo). IL-15 WT (negro) de R&D systems sirvió como control positivo.

65 Se probaron mutaciones con diferentes cadenas laterales en N112 para demostrar además el efecto del tamaño sobre la bioactividad. Como se muestra en la Figura 13B, N112Q (grande, rojo), N112S (mediano, verde) y N112A (pequeño, azul) mostraron una bioactividad aumentada inversamente proporcional al tamaño de las cadenas laterales. Además, el enlace de hidrógeno sugerido establecido por N112 de IL-15 y Y103 del receptor gamma de IL15 no parecen ser importantes para esta actividad, ya que N112A no puede formar tal enlace. Se usaron IL-15 WT

de R&D systems (negro) e IL-15-A10m3 producida por E. coli internamente (púrpura) como control positivo; se usó IL15 K86R-A10m3 parental sin desglucosilación (amarillo) como control negativo.

Ejemplo 3: Actividad *in vivo* de la variante de IL-15 e IL-15-ABD

La capacidad de IL-15 e IL-15-ABD para inhibir el crecimiento tumoral se evaluó mediante el uso de un modelo de melanoma de ratón B16-F10. Como se resume en la Figura 14, los ratones se trataron con IL-15, placebo PBS o varias dosis de IL-15-ABD por inyección IV en cuatro puntos de tiempo diferentes, separados por 48 horas. Como se muestra en la Figura 16, IL-15-ABD inhibe el crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis.

El análisis FACS se realizó para evaluar adicionalmente el perfil de las poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor en ratones tratados con IL-15-ABD de estos estudios. Como se muestra en la Figura 16, los tumores en los ratones tratados con IL-15-ABD mostraron un aumento en las poblaciones de células NK. Estos datos junto con las observaciones de aumento de la acumulación y retención del tumor en los ratones tratados con IL-15-ABD, como se describió anteriormente, sugieren que el ABD mejora el efecto proinflamatorio de IL-15 dentro del tumor. Los efectos del tratamiento con IL-15-ABD en poblaciones de linfocitos en bazo y tumores se resumen en las Figuras 17 y 18. Como se muestra en las Figuras 17 y 18, el análisis FACS de poblaciones linfocíticas muestra un aumento de 3 - 6 veces de las poblaciones de NK y CTL infiltrantes de tumor en los tumores de ratones tratados con IL-15 ABD. No se observaron diferencias significativas en el bazo. En conjunto, los resultados de estos estudios muestran la capacidad inmunomoduladora del tumor de IL-15-ABD *in vivo*.

Para evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de ABD para aumentar la semivida de IL-15, los ratones C57B se inyectaron por vía intravenosa con 5 μ g de IL-15-ABD o IL-15 sola y se evaluaron subsecuentemente las concentraciones séricas de IL-15-ABD e IL-15. Como se muestra en la Figura 20A, IL-15-ABD mostró una PK mayor en comparación con IL-15 WT. IL-15 T $\frac{1}{2}$ p = 0,6 h, similar a la informada en el dominio público (~0,5 h). Los resultados del estudio muestran que ABD extiende la T $\frac{1}{2}$ p de IL-15 a ~7,0 horas, lo que representa un aumento de ~10X. IL-15-ABD también se analizó para determinar la estabilidad en suero humano mediante el uso de un ensayo basado en células. Como se muestra en la Figura 19B, IL-15-ABD fue más estable en suero humano en comparación con control de IL-15, sin ABD.

Ejemplo 4: IL-12-ABD

Se fabricaron constructos de cadena simple de IL-12-ABD de ratón en células HEK293T y se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño. IL-12-A10m3 producida a partir de células HEK293T son completamente activas tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos basados en células. Como se muestra en la Figura 21A, IL12-A10m3 es capaz de unirse a la albúmina sérica de ratón, con una constante de disociación de equilibrio (KD) de 2,1 nM. IL12-A10m3 producida a partir de HEK293T también fue capaz de estimular la proliferación de PBMC humanas, comparable a la de IL12 de ratón producida internamente y a IL-12 de ratón disponible comercialmente (R&D) (Figura 21B). Además, la IL12-A10m3 producida a partir de HEK293T estimuló la secreción de interferón gamma de PBMC humanas, comparable a la de IL-12 de ratón producida internamente e IL-12 de ratón disponible comercialmente (R&D) (Figura 22).

El tratamiento con IL-12-ABD reduce el volumen tumoral *in vivo*.

La capacidad de IL-12 e IL-12-ABD para inhibir el crecimiento tumoral se evaluó mediante el uso de un modelo de melanoma de ratón B16-F10. Como se resume en la Figura 23, los ratones se trataron con IL-12-ABD o IL-12 a tres dosis similares mediante inyección IV el día 7 después de la inoculación del tumor (día 0), cuando el volumen tumoral alcanzó 100 mm³. El crecimiento del tumor se monitoreó cada 2 días después del tratamiento durante 10 días. El placebo de PBS sirvió como control. Como se muestra en las Figuras 24-26 y 28, tanto IL-12 como IL-12-ABD fueron capaces de reducir el crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis. Además, IL-12-ABD fue capaz de reducir el volumen tumoral más eficazmente en comparación con IL-12 sola a concentraciones similares (Ver, por ejemplo, Figura 26 a los 10 días y Figura 28, mediana de días para que el 50 % de los tumores alcancen 2000 mm³). Las mediciones de la masa corporal longitudinal de ratones de estos estudios muestran cambios mínimos en el peso en todos los grupos de tratamiento con IL-12-ABD (Figura 27). La falta de cambios significativos observados en la masa sugiere una falta de toxicidad de IL-12-ABD en grupos de tratamiento durante el curso posterior al tratamiento de 12 días.

Una caracterización adicional de los efectos farmacodinámicos de una dosis única de IL-12-ABD (4,5 μ g de IL-12-ABD, misma dosis molar que 3 μ g de IL-12 de control) en ratones portadores de tumores B16-F10 después de 5 días demostró que IL-12-ABD exhibió una supresión mayor similar del crecimiento tumoral en comparación con una dosis molar similar de IL-12 de control. Los ratones tratados con IL-12-ABD también mostraron un aumento correspondiente en la activación inmunitaria, como se muestra por un aumento en el peso del bazo y el IFN- γ , sin un efecto sobre el peso corporal del ratón, en comparación con el control (Figura 29).

La Figura 30 muestra además el resultado de un estudio que compara el volumen tumoral de ratones portadores de tumores B16-F10 a los 10 días, inyectados con IL-12-ABD (1,3 μ g), IL-12 (30 μ g) o placebo. Aunque la IL-12 (1 μ g) y

la IL-12-ABD (1,3 µg) son equivalentes molares y tienen la misma bioactividad *in vitro*, la IL-12-ABD es ~ 30+ veces más potente que IL-12 *in vivo* (comparar los resultados el día 10 en la Figura 30, 1,3 µg de IL-12-ABD > 30 µg de IL-12). La Figura 31 representa además los efectos hematopoyéticos de IL-12-ABD e IL-12 en ratones del estudio representado en la Figura 30 a los 3 y 7 días. Como se muestra en la Figura 31, los ratones tratados con IL-12-ABD mostraron una disminución transitoria de WBC, neutrófilos y linfocitos el día 3 en comparación con los ratones tratados con IL-12 y control de placebo. Sin embargo, tales poblaciones celulares regresaron a la normalidad el día 7. Además, los niveles de IFN-γ en ratones tratados con IL-12-ABD fueron más altos en los días 3 y 7, en comparación con los ratones tratados con IL-12 y control.

5 Evaluación de los efectos antitumorales de IL-12-ABD o IL-12 en combinación con anticuerpo anti-PD-1 *in vivo*.

El efecto de las terapias combinadas de dosis única mediante el uso de IL-12-ABD o IL-12 con anti-PD-1 se evaluó en ratones portadores de tumores B16-F10 a los 8 días (Figura 32).

15 Los animales (7 - 10 semanas de edad) se asignaron a 8 grupos (8 animales por grupo) 10 días después de la inoculación de células tumorales B16-F10 (2×10^4 células/rata). Los animales se asignaron en base al volumen tumoral. En el momento de la asignación, el volumen tumoral promedio por grupo fue de 100 mm³. El día 0 (cuando los tumores alcanzaron 100 mm³) a cada grupo se le administró una dosis única *i.v.* de PBS (placebo), IL12-ABD (1,5 µg, 5 µg, 15 µg) o IL15-ABD-IL12 (1,7 µg, 6 µg, 17 µg).

20 Los grupos se examinaron para determinar el peso corporal, el volumen tumoral y la pseudo viabilidad. Los pesos corporales se midieron antes de la inoculación del tumor y en el momento de las mediciones del tumor. El tamaño del tumor se midió cada 2 días en dos dimensiones mediante el uso de un calibrador, y el volumen se expresó en mm³ mediante el uso de la fórmula: $V=0,5 \times a \times b^2$ donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor. El estudio se realizó como pseudo-supervivencia; cada ratón se sacrificó cuando su tumor alcanzó 2000 mm³ o cuando se determinó que estaba moribundo.

25 Como se muestra en la Figura 33, IL-12-ABD fue más efectiva que el tratamiento con anti-PD-1 o la dosis equivalente molar de IL-12 recombinante. Además, IL-12-ABD fue tan efectiva como la combinación de tratamiento con IL-12 recombinante y anti-PD-1. Interesantemente, la adición de Ab anti-PD-1 a IL-12 recombinante mejoró la eficacia de cualquiera de los tratamientos solos, mientras que el tratamiento con anti-PD-1 no proporcionó ningún beneficio adicional a IL-12-ABD

30 Para evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de ABD para aumentar la semivida de IL-12, se inyectó a ratones C57B por vía intravenosa con 5 µg de IL-12-ABD o IL-12 sola y se evaluaron las concentraciones séricas de IL-12-ABD e IL-12. Como se muestra en la Figura 33, IL-12-ABD mostró una PK más alta que la IL-12 WT. IL-12 T $\frac{1}{2}p = 2,5$ h, similar a la informada en el dominio público (~3,5 h). Los resultados del estudio muestran que ABD extiende la T $\frac{1}{2}p$ de IL-12 a 9,5 horas, un aumento de ~4X.

40 Ejemplo 5: IL-15-ABD-IL-12 biespecífica

45 Los constructos de IL-15-ABD-IL-12, hIL15 (K86R/N112A)-A10m3-mIL-12sc y mIL-12sc - A10m3- hIL15 (K86R/N112A) se hicieron en células HEK293T y se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño. Las secuencias de estos constructos se representan en la Figura 34. La capacidad de constructos de hIL15 (K86R/N112A)-A10m3-mIL-12sc y mIL-12sc -A10m3- hIL15 (K86R/N112A) para unirse a MSA, receptor de IL12 beta 2 y receptor alfa de IL-15 se evaluaron mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 35, ambos constructos de IL-15-ABD-IL-12 fueron capaces de unirse a MSA de una manera dependiente de la dosis en medios de cultivo celular. Además, ambos constructos biespecíficos fueron capaces de unirse al receptor beta2 de IL12 y al receptor alfa de IL15 de una manera dependiente de la dosis en medios de cultivo celular. Como se muestra en la Figura 35, las IL-12/IL-15-ABD que tienen la orientación, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, IL-15-ABD-IL-12, mostraron una mejor unión al antígeno en comparación con IL-12-ABD-IL-15. Biespecíficos adicionales que incluyen IL-15 e IL-12 se describen en la Figura 36.

55 Evaluación de IL-15-ABD-IL-12 para actividad de IL-12 e IL-15

Se evaluó además IL-15-ABD-IL-12 para la actividad de IL-12 e IL-15 (Figuras 37 y 38).

60 Para evaluar la actividad IL-12, los linfocitos de PBMC se activaron mediante la formación de blastos mediante el tratamiento con PHA-P durante cuatro días y rIL-2 el tercer día. Los linfoblastos se trataron después con IL-15-ABD-IL-12 o control de IL-12 durante dos días y se evaluó la actividad de IL-12, en base a la proliferación de linfoblastos y la secreción de IFN-γ (Figura 37A). La actividad de IL-15 se evaluó mediante el uso de un ensayo de proliferación de linfocitos T citotóxicos CTLL-2 (Figura 38A).

65 Como se muestra en la Figura 37, IL-15-ABD-IL-12 mostró actividad IL-12 según se evalúa por la proliferación de linfoblastos (Figura 37B) y la secreción de IFN-γ (Figura 37C). Además, IL-15-ABD-IL-12 mostró IL-15 en el ensayo

de proliferación CTLL-2 (Figura 38B). Como tal, la IL-15-ABD-IL-12 objeto exhibió tanto bioactividad IL-12 como IL-15.

Efectos antitumorales de IL-15-ABD-IL-12 en un modelo de melanoma de ratón B16-F10

5 Sin estar ligado a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que las IL-15/IL-12 ABD proporcionan actividad biológica sinérgica. En particular, IL-12 aumenta receptor alfa de IL-15, IFN- γ , células NK/T e inmunidad TH1, mientras que regulan negativamente las células Treg. IL-15 aumenta receptor beta 1 IL-12 y células NK, mientras reduce la pérdida de memoria de células CD8.

10 Los efectos antitumorales y la pseudo supervivencia de IL-12-ABD a IL15-ABD-IL12 se evaluó mediante el uso en el modelo de melanoma de ratón B16-F10 (Figura 39).

15 Se asignaron animales (7-10 semanas de edad) a 8 grupos (8 animales por grupo) 10 días después de la inoculación de células tumorales B16-F10 (2×10^4 célula/ratón). Los animales se asignaron en base al volumen tumoral. En el momento de la asignación, el volumen tumoral promedio por grupo fue de 100 mm^3 . El día 0 (cuando los tumores alcanzaron 100 mm^3) a cada grupo se le administró una dosis única i.v. de PBS (placebo) o equivalentes de dosis molar de IL12-ABD (1,5 ug, 5 ug, 15 ug) o IL15-ABD-IL12 (1,7 ug, 6 ug, 17 ug).

20 Como se muestra en la Figura 39, IL-15-ABD-IL-12 fue superior en actividad antitumoral en comparación con IL-12-ABD en el modelo de ratón B16-F10 a concentración molar igual. Otros estudios in-vivo similares muestran que la IL-12 (5 ug) en combinación con I-15 (1 ug) es menos de 50 % tan potente como IL-15-ABD-IL-12 (6 ug) (datos no mostrados).

25 Ejemplo 6: Anti-TGF β -ABD

Después de ciclos de selección y el cribado realizado mediante el uso de la tecnología de resonancia de plasmones superficiales, se identificaron dominios de unión a hTGFp1: 1A10, 1F11, 2H6, 4B9, 4C10, 4D9, 4G3, 4G6, 4H4, 4H7 y 6H11. Estos clones mostraron reactividad cruzada con hTGFp2,3 y mTGFp1 y con posible inhibición de la unión de hTGFp1 a su receptor II. Los clones se seleccionaron subsecuentemente para purificación como scFv y caracterización adicional

30 Los scFv se cribaron para determinar la reactividad cruzada con TGFp-1 de ratón y humano mediante el uso de técnicas de ELISA estándar. Los ELISA de unión muestran que 2H6, 4G3, 4H7, 4B9, 4D9 y 6H11 tienen una buena reactividad cruzada contra mTGFp-1 y hTGFp-1.

35 Se realizó un ELISA de unión y bloqueo para determinar si los scFv anti-TGFp-1 fueron capaces de unirse a TGFp-1 y bloquear su interacción con TGFpR-II. 2H6,4G3,4H7,4B9 y 4D9 muestran una buena eficacia de bloqueo e inhibición de la interacción de mTGFp y mTGFpR-II.

40 Se probó la capacidad de varios de estos scFv anti-TGFp-1 para interferir con la bioactividad de TGFp-1. Las secuencias de los scFv anti-TGFp-1 4H7 y 4D9 se muestran en las Figuras 40A y B.

45 Bloqueo de la expansión de CD4 inducida por células T reguladoras TGF β 1⁺Foxp3⁺

Las células T reguladoras (Treg) son capaces de influir en la homeostasis del sistema inmunitario. Tales Treg son esenciales para mantener la autotolerancia, ya que los defectos pueden conducir a enfermedades autoinmunitarias graves. En el cáncer, las células tumorales son capaces de secretar citocinas que afectan la homeostasis del sistema inmunitario. En particular, las células tumorales pueden secretar TGFp, que después puede afectar el número de Treg circulantes. Se ha demostrado previamente que la exposición a TGFp1 conduce a una expansión de subconjuntos de Treg CD4⁺Foxp3⁺ de células T CD4⁺Foxp3⁻. Estas Treg inducidas son capaces de contribuir a la inducción de una respuesta anérgica de células T mediante la inhibición de la activación de células T CD8⁺ citotóxicas específicas de antígenos tumorales.

50 Como se muestra en la Figura 41, el TGFp1 recombinante es capaz de estimular la expansión de Treg CD4⁺Foxp3⁺ de una población de células T mixtas aislada de PBMC de donantes humanos sanos. El bloqueo de TGFp con anticuerpo anti-TGFp 1D11 o el TGF-p1 scFv2H6,4H7, y 4D9, sin embargo, inhiben todos significativamente la expansión inducida por TGFp de Treg CD4⁺Foxp3⁺ también de manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, tales TGFp1scFv son útiles para reducir la expansión de TReg en los cánceres.

60 Bloqueo de la transición epitelial a mesenquimal (EMT) inducida por TGF β 1

65 Se conoce que la exposición a TGFp induce la transición epitelial a mesenquimal. Durante este proceso, las células epiteliales se transdiferencian de una lámina epitelial de células organizada, polarizada y estrechamente conectada con morfología de adoquín en células desorganizadas y móviles que parecen mesenquimales en morfología. Durante la EMT, la capacidad invasiva de las células se activa y de esta manera mejora la capacidad tumorigénica

de las células. La E-cadherina es un marcador comúnmente usado de células epiteliales, y se localiza en las uniones adherentes entre las células epiteliales. La pérdida de E-cadherina es un marcador fuerte de EMT que es indicativa del proceso de transdiferenciación. (Figura 42A). Adicionalmente, la vimentina se asocia con células altamente móviles. Por lo tanto, la inducción de la expresión de vimentina en las células también es indicativa de una mayor motilidad y una mayor invasión localizada *in vivo*.

Como se muestra en las Figuras 42 y 43, el bloqueo de TGF-p por anticuerpo 1D11 anti-TGF-p o el scFv de TGF-p1 invierte la transición epitelial a mesenquimal inducida por TGF-p1 (Figura 42) y la migración (Figura 43). Las células 4T1 de ratón se cultivaron en medio de crecimiento suplementado con TGF-p1 (panel 2); TGF-p1 y 1D11 (panel 3); o TGF-p1 y scFv anti-TGF-p1 (panel 4), después se fijaron y se tiñeron con anticuerpo contra E-cadherina (verde) y anticuerpo contra vimentina (púrpura). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). El tratamiento con TGF-p1 indujo la pérdida de E-cadherina de las uniones célula-célula y aumentó la expresión de vimentina.

Este efecto se revierte mediante la adición de 1D11 o el scFv anti-TGF-p1 objeto descrito en la presente descripción (Figuras 42 paneles 3 y 4).

Además, el scFv anti-TGF-pi descrito en la presente descripción es capaz de bloquear la migración de células de carcinoma mediada por TGF-pi (Figura 43).

Neutralización de la activación de Smad inducida por TGFβ1

La superfamilia TGFp consiste en citocinas pleiotrópicas que regulan varios procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, la migración, la supervivencia celular, la angiogénesis, la cicatrización de la herida y la vigilancia inmunitaria. En humanos, la isoforma predominante es TGFp1, que se expresa en varios tipos de tejidos. El TGFp inhibe la proliferación de la mayoría de las células epiteliales normales. Adicionalmente, durante las primeras etapas de los cánceres de origen epitelial, el TGFp funciona como un inhibidor del crecimiento celular. Por lo tanto, durante el inicio del cáncer, el TGFp actúa como un supresor tumoral. Sin embargo, durante las etapas posteriores de la progresión del cáncer, las células tumorales se vuelven resistentes a los efectos inhibitorios del crecimiento de TGFp, y TGFp asume un papel de promotor tumoral. De hecho, se ha demostrado que TGFp1 se sobreexpresa en varios tumores. La activación de la vía de TGFp se produce mediante la unión del ligando de TGFp al receptor de TGFp tipo II (TpRII), que después induce una asociación y oligomerización entre TpRII y TpRI. Cuando se forma este oligómero, Smad2 y Smad3 se reclutan y se fosforilan por TpRI. El Smad2 o Smad3 fosforilado se une después a Smad4 en el citoplasma, y este complejo se transloca al núcleo donde interactúa con la región promotora y activa la transcripción de los genes diana. Por lo tanto, la activación de la vía de TGFp es medible por la rápida fosforilación de Smad2 después de la adición de TGFp a células privadas de suero. Sin embargo, el bloqueo efectivo de TGFp inhibirá la fosforilación de Smad2. Aquí, la ausencia de la fosforilación de Smad2 puede usarse como una medida del bloqueo efectivo de TGFp por los constructos de scFv anti-TGFp objeto.

Mediante el uso de células humanas (Figura 44A) o de ratón (Figura 44B) privadas de suero, se determinó que la adición de TGFp1 recombinante humano (Figura 44A) o TGF-p1, -p2 y -p3 de ratón (Figura 44B) indujo la fosforilación de Smad2. Tal fosforilación se reduce de una manera dependiente de la dosis cuando el TGFp se preincuba con el anticuerpo anti-TGFp 1D11 de control o los constructos de scFv de TGF-p1 2H6, 4H7 y 4D9. Estos datos sugieren que los constructos de scFv 2H6, 4H7 y 4D9 son capaces de secuestrar TGFp1 e inhibir su interacción con TpRII/TpRI, de esta manera inhiben la cascada de activación de TGFp durante el cáncer en etapa avanzada.

4D9 anti-TGFβ-1-ABD

Las secuencias de constructos de scFv de TGF-p1-ABD ilustrativos (4D9M-A6m y 4H7-A6m) se muestran en la Figura 45A. Como se muestra en la Figura 45B, el anti-TGFp-1-ABD extendió la T_{1/2} de scFv anti-TGFp-1 de 106 minutos a 10,6 horas.

Se evaluó la unión de scFv anti-TGF-p1-ABD (bivalente para TGF-p1) producidos en células de E. coli y HEK a la albúmina sérica de ratón (Figura 47). Se evaluaron tres orientaciones diferentes de los constructos: dos scFv anti-TGF-p1 unidos al N terminal del ABD ("Bi N Term"); dos scFv anti-TGF-p1 unidos al C terminal del ABD ("Bi C Term"); o un scFv anti-TGF-p1 unido a cada uno del N terminal y C terminal del ABD ("Bi Mid"). Como se muestra en la Figura 46, todos los constructos mostraron unión a la albúmina sérica de ratón. Con respecto a los constructos producidos en E. coli, Bi Mid mostró una mejor unión a MSA que la orientación N Term. Con respecto a los constructos producidos en células HEK, la orientación N Term de Bi mostró una mejor unión a MSA que la orientación Bi Mid o Bi C term.

Como se muestra en la Figura 47, la inhibición mediada por TGFp-1 de la proliferación de células T se revirtió (es decir, aumentó la proliferación de células T) mediante tales constructos (Figura 46B). Además, se ha demostrado que 4D9M-ABD bloquea la unión de TGFp-1 humano y TGFp-3 humano con receptores cognados (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un dominio de unión a albúmina (ABD) de

5 EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSG
 YIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIW
 10 GQGTMTVYSSASTGGGGSGGGGSGGGGSHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGN
 NIGTKSVHWYQQKPGQAPVLLVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDE
 ADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG.

15 2. Una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina (ABD) que comprende un ABD de
 EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGIT FDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSG
 YIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIW
 20 GQGTMTVYSSASTGGGGSGGGGSGGGGSHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGN NIGTKS
 VHWYQQKPGQAPVLLVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD-
 YYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG unido a una primera pareja de fusión.

25 3. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la primera pareja de fusión es una citocina.

4. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la primer pareja de fusión es un scFv que comprende una cadena pesada variable de scFv y una cadena ligera variable de scFv.

30 5. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la proteína de fusión de dominio de unión a albúmina comprende una segunda proteína de fusión que se une al ABD.

6. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión son cada una, una citocina.

35 7. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la proteína es de acuerdo con la fórmula: (FP1)-L1-(ABD)-L2-(FP2), en donde el ABD es una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina;
 en donde FP1 y FP2 son la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión, respectivamente; y
 en donde L1 y L2 son un primer y un segundo enlazador, respectivamente.

40 8. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión son cada una, una citocina.

45 9. La proteína de fusión de ABD de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión son cada una un scFv.

10. Un ácido nucleico que codifica un dominio de unión a albúmina de acuerdo con la reivindicación 1.

50 11. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.

12. Un método para fabricar un dominio de unión a albúmina, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 en condiciones en donde se produce el dominio de unión a albúmina y recuperar el dominio de unión a albúmina.

55 13. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de dominio de unión a albúmina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9.

14. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13.

60 15. Un método para fabricar una proteína de fusión ABD, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 14 en condiciones en donde se produce la proteína de fusión de ABD y recuperar la proteína de fusión de ABD.

65

Extremo N-terminal

Extremo C-terminal

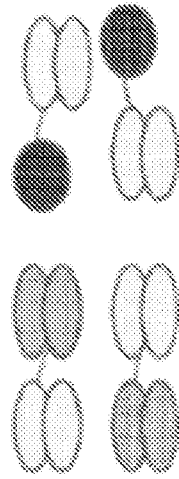


Figura 1A

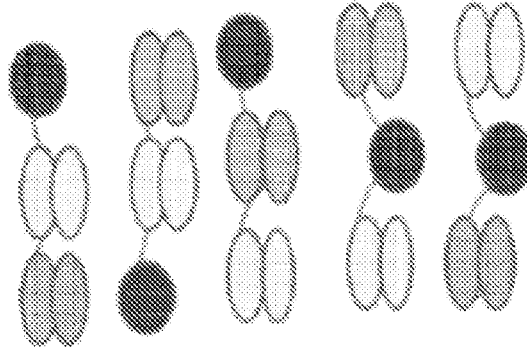


Figura 1B



Resto de unión - Ab o fragmento (por ejemplo, scFv)

Enlazador (L)

Dominio de unión a albúmina

Citocina

Figura 1C

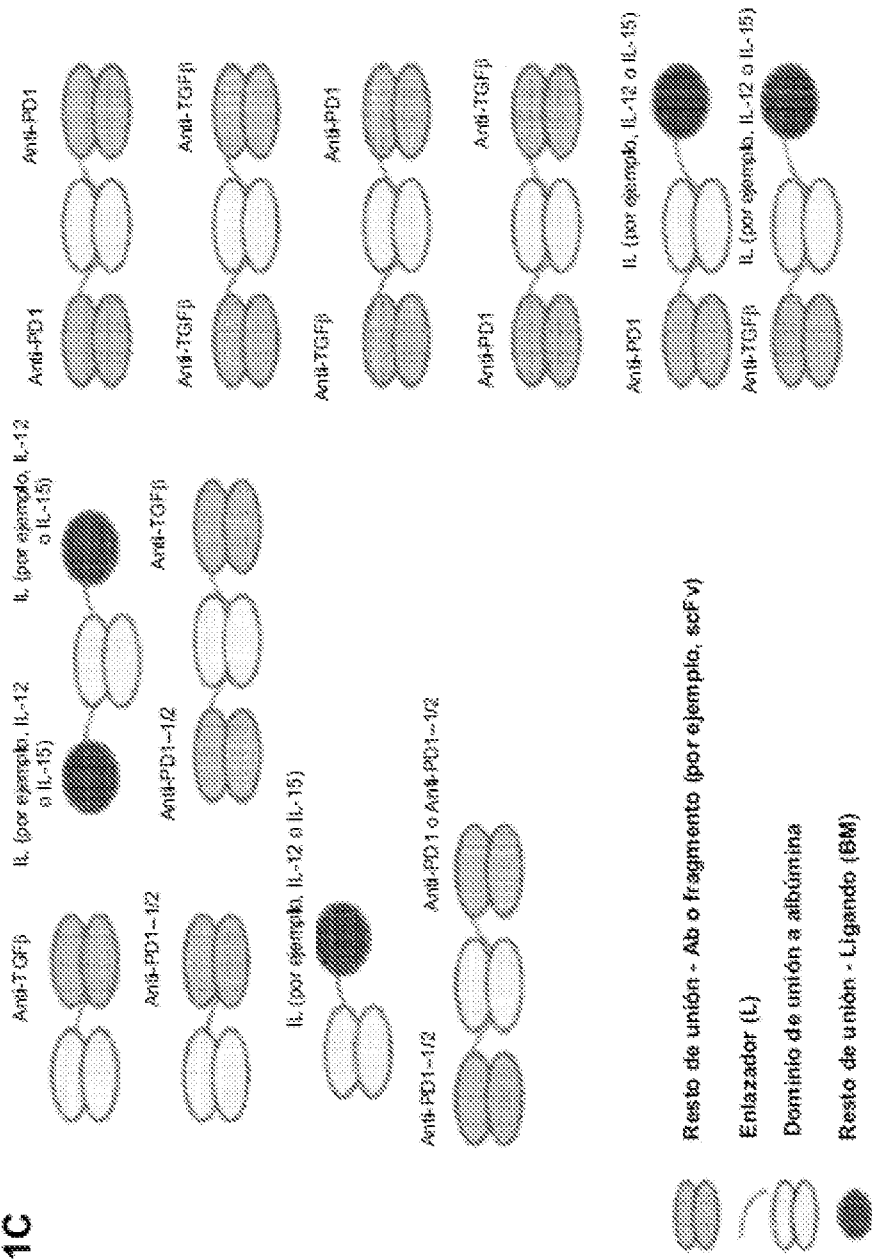


Figura 2A

A10

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVESGGGLVQPGASLRSLRSCAASGITFDYVMHWVRQAPGKGLVWVAGI SSNSGYADSVRGRFTISRDNKNSLFLQMNRLRPEDTALYYCVKGLYSNP RGGAFDIWGQGTMTVSS	
vhCDR1	GITFDYV	
vhCDR2	ISSNSGM	
vhCDR3	VKGLYSNPRGGAFDI	
Cadena ligera variable (vl)	SYVLTQPPSVSVAPGQIATITCGGNIGTKVHWYQKPGQAPVLYVYADS DRPSGIFERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYCCQWDSRSDHLWVFGG GTKLTVLG	
vlCDR1	NIGTKS	
vlCDR2	ADS	
vlCDR3	QWDSRSDHLWV	

Figura 2B

A10m1

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVESGGGLIQPGRSRLSCAASGTFDDHYMHHWVRQAAPGKGLEWVAG ISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMINRLRAEDTAVYYCVKGLYSN PRGGAFDIWGOGTMTVSS	
vhCDR1	GIFFDDHY	
vhCDR2	ISSNSGYI	
vhCDR3	VKGLYSNPRGGAFDI	
Cadena ligera variable (vl)	SYVLTQPPSVSVAPGQTAITTCGGNIGTKSVHWYQQRPGQAPVLVYADS DRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGG GTRLTVLG	
vlCDR1	NIGTKS	
vlCDR2	ADS	
vlCDR3	QVWDSRSDHLWV	

Figura 2C

A10m2

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVESGGGLQIPGRSIRESCAASGITFDIDYAMHWVROAPGKGLEWVYAGI SSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMINRLRAEDTAVYYCVKGLYSN PRGGAFDIWGQGTMTVYSS	
vHCDR1	GITFDIDYA	
vHCDR2	ISSNSGM	
vHCDR3	VKGLYSNPRGGAFDI	
Cadena ligera variable (vl)	SYVLTQPPFSVAVPQQATITCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLLVYADS DRPSGIFERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGG GTKLTVLG	
vLCDR1	NIGTKS	
vLCDR2	ADS	
vLCDR3	QVWDSRSDHLWV	

Figura XX

Figura 2D

A10m3

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVESGGGLUOPGKSRISLSCAASGITFDDAVMHHWVRCAPGKGLEWVAG ISSNSGYGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSN PRGGAFDHWGGGTMTVSS	
vHCDR1	GITFDDAV	
vHCDR2	ISSNSGYI	
vHCDR3	VKGLYSNPRGGAFDI	
Cadena ligera variable (vl)	SYVLTQPPSYSVAPGQTATITCGGNIGTKSVHWYDQKPGQAPVLLVYADS DRPSGIPERYSGSNSGNTATLTSRVEAGDEADYYCQWDSRSDHILWVFGG GTKLTVIG	
vLCDR1	NIGTKS	
vLCDR2	ADS	
vLCDR3	QWDSRSDHILWV	

Figura 2E

A6

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVCSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFNSTWIGWVRCMPGKGLEWMAI YPGDSITRYSPSFQGGQVTFVSKSINTAYLVWTSLKASDTAIYYCARQRWGS SSFDLWGGGTLVTVSS	
vHCDR1	GYSFNSTW	
vHCDR2	YPGDSIT	
vHCDR3	ARQRWGSSTFDL	
Cadena ligera variable (vl)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGMNYVSWYQQLPGTAPKLLIYEN NKRPSG PDRFSGSKSGTSATLGTIGLQIGDEADYICGTWDSLSAGVFGGG TQLTVLG	
vLCDR1	SSNIGMNY	
vLCDR2	ENN	
vLCDR3	GTWDSLSAGV	

Figura 2F

A6m

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVQSGAEVRRPGEGLKISKCKGSGYSFNSYWGIVRMPGKGLEWNGH YPGDSITRYSPSFCGQVTFSDKSNITAYLQWSSLKASDAAMYCARQRW GSSSFDAWGGGTLTVSS	
vhCDR1	GYSFNSYW	
vhCDR2	YPGDSIT	
vhCDR3	ARQRWGSSSFD	
Cadena ligera variable (vl)	QSVLTQPPSYSAAPGOKVITCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIEN NKRFSG PDRFSGSKSGTSAITGITGLQIGDEADYYCGTWDSSLSAGVFGGG TQLTVLG	
vlCDR1	SSNIGNNY	
vlCDR2	ENN	
vlCDR3	GTWDSSLSAGV	

Figura 2G

A9

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVQSGAEVKKPKGKSGESLKISKIKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWVWGII YPGDSDRYSPSFEFGQVTSADKISISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLHGVS RGDYWGOGTLTVSS	
vhCDR1	GYSFTSYW	
vhCDR2	IYPGDSDT	
vhCDR3	ARLHGVSRGDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQPAIVSGSPGDSITISGSSLAGSYNLVSWYQCYPGKAPKLIHEVT KRPSGVSNRFSGKSGNTASLTISGLQADDEAEYSCSSYAGRNAVAVFGGGT QLTVLG	
vlCDR1	SSLAGSYNL	
vlCDR2	EVT	
vlCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2H

A9m

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVQSGAEVKKPKGELKIKESCIGSGYSFTSYWIGWVVRQMPGKGLEWMGII YPGSDTRISPSFEGQVTTISADKISITAYLQWSSLKASDTAAYYCARLHGVS RGD*WGGQGLTVSS	
vHCDR1	GYSFTSYW	
vHCDR2	IYPGSDIT	
vHCDR3	ARLHGVSRGDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQPAISVSGSPGQSITISCSGSSLAGSYNLVSWYQQYFGKAPKLIYEVT KRPSGYSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEAEYSCSSYAGRNAVAVFGGTT QLTVLG	
vLCDR1	SSLAGSYNL	
vLCDR2	EVT	
vLCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2I

A11

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVETGGGVVRPGGSLRSLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLSQMNSLRRAEDTAVYYCAKSSGWY PYYGMDVWGGGTTVSS	
vhCDR1	GFTFSYA	
vhCDR2	ISGSGGST	
vhCDR3	AKSSGHWYPPYYGMDV	
Cadena ligera variable (vl)	SYELMQPPSVSVSPGQTARITCSGNILGDKYSWYQKPGQSPVMIYQD TRPFGIAERFSGNSGNTATLTISGTOALDEADYVCCQAWDTGTAVFGGT QLTVLG	
vlCDR1	NIIGDKY	
vlCDR2	QDT	
vlCDR3	QAWDTGTAV	

Figura 2J

A11m

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVETGGGVIRPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNSLRAEDTAAYYCAKSSGWY PYYGMDEVWGQGTITVTVSS	
vHCDR1	GFTFSSYA	
vHCDR2	ISGSGGST	
vHCDR3	AKSSGWYPPYYGMDEV	
Cadena ligera variable (vl)	SYELMCPSPSVSPGQTARITCSGNILGDKYTSWYQHEKPGQSPVMVYQD TKRPSGIAERFSGNSGNTATLIRISGTQALDEADYYCQAWDITGTAVFGGGT QLTVLG	
vLCDR1	NLGGKY	
vLCDR2	QDT	
vLCDR3	QAWDITGTAV	

Figura 2K

A4

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCAQFGYFNFNWYWGIVYVROMFGKGLEWMG IYPGDSJTRYSPSFQGGQVTSADKRSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRSTVT KSFDIWGGQGTMTVTSS	
vHCDR1	GYNFNA YW	
vHCDR2	YYPGDSDT	
vHCDR3	ARRSTVTKSFDI	
Cadena ligera variable (vl)	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLCTGNSNIVGKQGAWILQQHQGHPPKLLSY SSINRPVGISERFSAKRSQNTASLTITGLQPEDEADYYCSAWDSSLSAWYFGG GTKLTVLG	
vLCDR1	SNIVGKQG	
vLCDR2	SSI	
vLCDR3	SAWDSSLSAWV	

Figura 2L

B2

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSSSSSYWGWIROPKKGLEWIGSI</p> <p>YSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARRSAWSSG</p> <p>WSTLRYYYGMDVWGQGTITVSS</p>	
vHCDR1	GGSSSSSY	
vHCDR2	IYSGST	
vHCDR3	ARRSAWSSGWSTLRYYYGMDV	
Cadena ligera variable (vl)	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIATYLAWYQONPGQAPRLIYDASTR</p> <p>ATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCOERSNWSRLTFGGGTKVEIK</p> <p>R</p>	
vLCDR1	QSIATY	
vLCDR2	DAS	
vLCDR3	QERSNWSRLT	

Figura 2M

1B4

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVDSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQVPGRGLEWLAIY PGDSOTRYSPSFEGQVTSADKKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLHGVS R GDYWGQGTELVTVSS	
vhCDR1	GYSFTNTW	
vhCDR2	YPGDSDT	
vhCDR3	ARLHGVS R GDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQPAASVSGSPGQSTISCSGSSLAGSYNLVSWYQQYFGKAPKLIIEVT KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEAEYS CSYAGRNAVAVFGGGT QLTVLG	
vlCDR1	SSLAGSYNL	
vlCDR2	EVT	
vlCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2N

2D11

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVQSGAEVKKRPGESLKESCCKGSGYSFTNYWIGWVWRQMPGEGLEWMGH YPGDSDTTRYSPSEFEGQVTISADKKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLHGVYS RGDYWGQGGLTVTSS	
vhCDR1	GYSFTNYW	
vhCDR2	IYPGDSDT	
vhCDR3	ARLHGVVSRGDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQPAVSVSGSPGQSITISCSGSSLAGSYNLVSWYQQYPGKAPKLINYEVT KRPSGVSNRPSGSKSGNTASLTISGLQADDEAEYSCSSYAGRNAVAVFGGGT QLTVLG	
vlCDR1	SSLAGSYNL	
vlCDR2	EVT	
vlCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 20

ZE11

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EYQLVQSGAEVKKPGESLKISKCSGSGYSFTNYWIGWVROMPGEGLEWMGII YPGDSITRYSPSFEQGVTISADKISITAVLQWNSLKASDTAMVYCARLHGIV SRGDYWGQGTLLVTVSS	
vhCDR1	GYSFTNYW	
vhCDR2	YPGDSIT	
vhCDR3	ARLHGIVSRGDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQPAASVSGSPGQSITISCSGSSLAGSYNLVSWYQQYFGKAPKLIYEVT KRPSGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQADDEAEYSCSSYAGRNAVAVFGGGT QLTVLG	
vlCDR1	SSLAGSYNL	
vlCDR2	EVT	
vlCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2P

2F1

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVETGGGVVQPGGSRISLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKLEWVS GISGSSNSIYYADSVKGRFTIARDNAKNTLFLQVNSLRAEDTAVYYCARHHGR LYYYGMDVWGQGTITVVS	
vHCDR1	GFTFSNVA	
vHCDR2	ISGSSNSI	
vHCDR3	ARRHGFLLYYYGMDV	
Cadena ligera variable (vl)	SYELTFPPSVSPGQTASITCSGDKLGEKYSWYQKPGQSPVMIYQDR KRPSSGIPERFSGNSGNATLTISGTQAMDEADYYCAWDITTPGFGGGTK VTVLS	
vLCDR1	KLGEKY	
vLCDR2	QDR	
vLCDR3	CAWDITTPG	

Figura 2R

161

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVCSGAEVKKPGESLKISKCKGSGYFSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSITRYSPSFEQQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLHGVS RGDYWGQGLTVSS	
vhCDR1	GYFSYW	
vhCDR2	IYPGDSIT	
vhCDR3	ARLHGVSRGDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQPA SVSGSPGQSITSCSGISLAGSYNLVSWYQQYFGKAPKLIYEV KRPSGYSNRFSGSKSNTASLTISGLQADDEAEYSCSYAGRNAVAVFGGGT QLTVLG	
vlCDR1	SSLAGSYNL	
vlCDR2	EVT	
vlCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2S

2A5

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVDSGAEVKKPGEISLKISCKGSGYNFNISYWIWVRRQMPGKGLEWMGI IYPGDSITRYGPPFKGQATISADKISINTAYLQWSSLRPSDTAIFYCARLVGEG RSIQYWGQGLTVTVSS	
vHCDR1	GYNFNISYW	
vHCDR2	IYPGDSIT	
vHCDR3	ARLVGEGRSIQY	
Cadena ligera variable (vl)	QPVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSGYRNKYVDWYQQRPQKGPAPFVNRVVG TGGVGSKGDGIPDRFSALGSGLNRYLTIKDQGEEDSDYYCGADYGSNSNFI VVFEGGTLTVLG	
vLCDR1	SGYRNKY	
vLCDR2	VGTGGVVG	
vLCDR3	GADYGSNSNFIIV	

Figura 2T

2A9

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVCSGAEVKKPKGESLKISCKASGYDFTRYWIVWVRQMPFGKGLEVMGII YPGDSDFTRYGPPFKGQATISADKSINTAYLQWSSLRPSDTATYYCARLVGEGR SIQFWGGGLVTVSS	
vHCDR1	GYDFTRYW	
vHCDR2	IYPGDSDF	
vHCDR3	ARLVGEGRSIQY	
Cadena ligera variable (vl)	QPVLTQPPSASASLGASVTLCTLTSGYRNKYVDWYQRPFGKGRFVVRVVG TGGVGSKGDGIPDRFSALGSGLNRYLTKDIQEEDESDYVCGADYGSQSNFL VWFGGCTKVTVLG	
vLCDR1	SGYRNY<	
vLCDR2	VTGGIVG	
vLCDR3	GADYGSQSNFLW	

Figura 2U

2E9

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVDSGAEVKKPKGSELKISKCKGSGYSFTRSWIAWVRQMPGKGLEWNGII YPGDSOTRYSPEFGQVTISADKISITAYLQWSSLKASDTAMYYCARLHGVS RQDYWGQGLTVVSS	
vHCDR1	GYSFTRSW	
vHCDR2	YPGDSDT	
vHCDR3	ARLHGVSQGDY	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQ ² ASVSGSPGDSITISCSGSSLAGSYNLVSWYQYPGKPKLIYEVT KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEAEYS ² SSYAGRNAVAVFGGGT QLTVLG	
vLCDR1	SSLAGSYNL	
vLCDR2	EVT	
vLCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2V

2H6

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVCSGAEVKKIPGESPKISKGGSYFTNHWIGWVROMPGGLEWMI IYPGDSDFRYSFSEGGQVTSADKSIATVQWSSLKASDTAMYYCARLHG VVSIRGDIYWGQGLTVSS	
vHCDR1	GYSFTNHW	
vHCDR2	IYPGDSDF	
vHCDR3	ARLHGVSIRGDI	
Cadena ligera variable (vl)	QSALTQ ² ASVSGSPGQSTISGSSLAGSYNLVSWYQQYPKAPKLIYEV TIRPISGYSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEAEYSCSYAGRNAVAVFGG GTQLTYLG	
vLCDR1	SSLAGSYNL	
vLCDR2	EVT	
vLCDR3	SSYAGRNAVAV	

Figura 2W

2H11

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVETGGGVWRPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVROAPGKLEWVS AISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLSQMNSLRAEDTAVYYCAKSSG WYPIYYGMDVWVGQTTVTSS	
vHCDR1	GFTFDDYA	
vHCDR2	ISGSGGST	
vHCDR3	AKSSGWYPIYYGMDV	
Cadena ligera variable (vl)	SYELMQPPSVSPGQTARITCSGNLGDKYTSWYQHKPQGSPMVIYQD TKRPSGIAERFSGNSGNTATLTISGTCALDEADYYCOAWDTGTAVFGGGT QLTVLG	
vLCDR1	NLGDKY	
vLCDR2	QDT	
vLCDR3	QAWDTGTAV	

Figura 2X

109

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVETIGGGVVOFGGSLRSLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKLEWVS GISGSSCSIGYADSYKGRFTIARDNAKNTFLQVNSLRRAEDTALYYCARHHGR LYYYGMDVWVWGQGTTVVSS	
VHCDR1	GFTFSNYA	
VHCDR2	ISGSSGSI	
VHCDR3	ARHHGRLYYYGMDV	
Cadena ligera variable (vl)	SYELTQDPAVSVAIGQTVRITCQGDLSRYYASWYQOKPGQAPVLYYGN NRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGACAEDEADYYCNSRDSSTVWFGGTKL TVLG	
VLCDR1	SLRSYY	
VLCDR2	GKN	
VLCDR3	NSRDSSTVW	

Figura 2Y

2B4

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	EVQLVETGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMN SLRAEDTAVYYCAKSSGWYPYYYGMDVWGQGTTVTVSS	
vhCDR1	GYSFTSYW	
vhCDR2	IYPGDSDT	
vhCDR3	VKGLYSNPRGGAFDI	
Cadena ligera variable (vl)	SYELMQPPSVSVSPGQTARITCSGNNLGDKYTSWYQHKPGQS PVMVIYQDTKRPSGLAERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADY YCAAWDTGTAVFGGGTQLTVLGLOG	
vlCDR1	NLGDKY	
vlCDR2	QDT	
vlCDR3	CAAWDTGTAV	

Figura 2Z

Secuencia de aminoácidos A10m3

EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNS
GYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFD
IWQGTMVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITC
GGNNIGTKSVHWYQQKFGQAPVFLVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISR
EAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: XX)

Cadena pesada variable

EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNS
GYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFD
IWQGTMVTVSSAST

Cadena ligera variable

VHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQQKFGQAPVFLVYADSD
RPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLT
VLG

Figura 3
Variante de IL-15

- IL 15 parental**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcKccceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)
- IL 15 K96A**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcAecceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)
- IL 15 K96R**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcKccceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)
- IL 15 N112A**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcKccceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)
- IL 15 N112S**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcKccceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)
- IL 15 N112Q**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcKccceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)
- IL 15 K96R/N112A**
nwwrvtsdtkkiedliqsmhidadatytesdvhpockvtamkcfllkqyislesgdashtv enlihaamsbsngvtesgcKccceleeknikkeflqsfvhiwqmfims (SEQ ID NO: XX)

Figura 6

A

1- MWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVY
 39-AMKCFLELOVISLESCDASIHDTVENLILANNLSLSS
 77-NGNVTESGCKEKEELEKNIKEFLQSPVHIVQMFINTS
 + ++ +

B

Salida:

Residuo	Puntuación	Ubiquitinada
10	0,41	No
11	0,43	No
36	0,43	No
41	0,36	No
66	0,68	Si Confianza baja
94	0,53	No
97	0,51	No

Leyenda:

Marca de	Intervalo de puntuac.	Sensibilidad	Especificidad
Confianza baja	0,62 ≤ s ≤ 0,69	0,464	0,903
Confianza media	0,69 ≤ s ≤ 0,84	0,346	0,950
Confianza alta	0,84 ≤ s ≤ 1,00	0,197	0,989

Figura 7

Mutagénesis para generar un constructo resistente a la ubiquitinación

A) Mejora de la estabilidad a través del dominio sushi del receptor alfa de IL15



Unión -> aumento de la estabilidad

B) Mejora de la estabilidad mediante la prevención de la degradación dependiente de ubiquitina

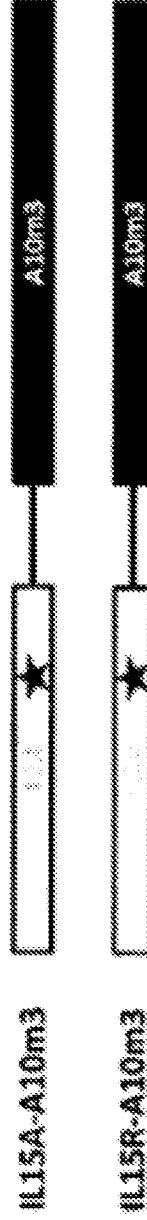


Figura 8A

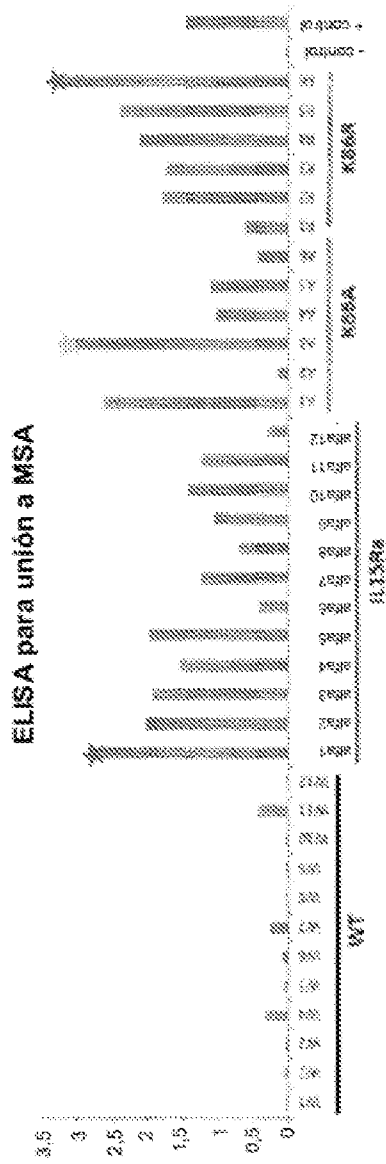


Figura 8B

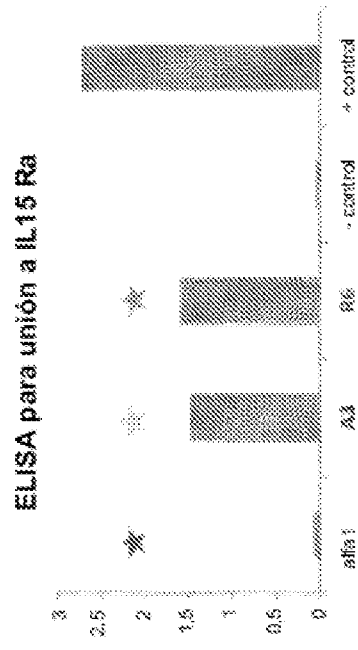
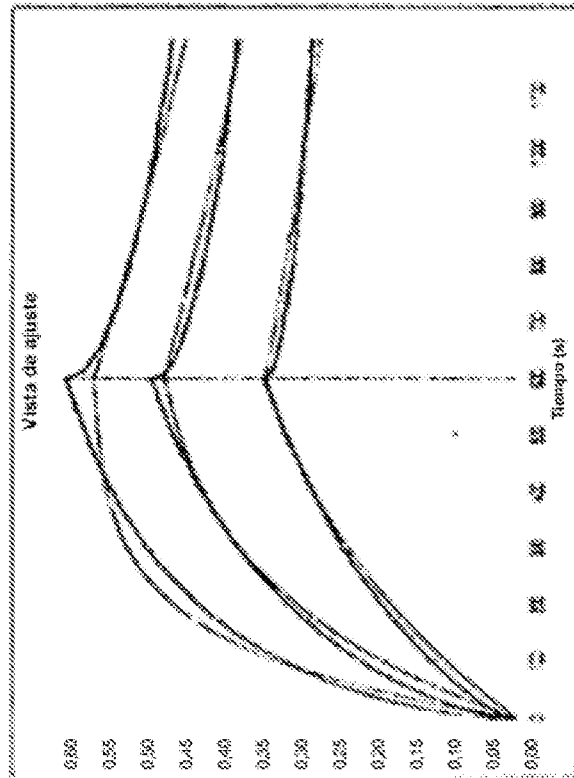


Figura 10



Octet-HIL 15RS-A10m 3 B01 HSA pH 7.2 1-13-2016

ID de muestra	Conc. (nM)	Respuesta	KD (nM)	R ² completo
IL15R6-A10 Lote 1.1 pH 7.2	138,9	0,6225	2,89E-08	0,988743
IL15R6-A10 Lote 1.1 pH 7.2	69,4	0,5048	2,89E-08	0,988743
IL15R6-A10 Lote 1.1 pH 7.2	34,7	0,348	2,89E-08	0,988743

KD = 28,9 nM

Figura 11

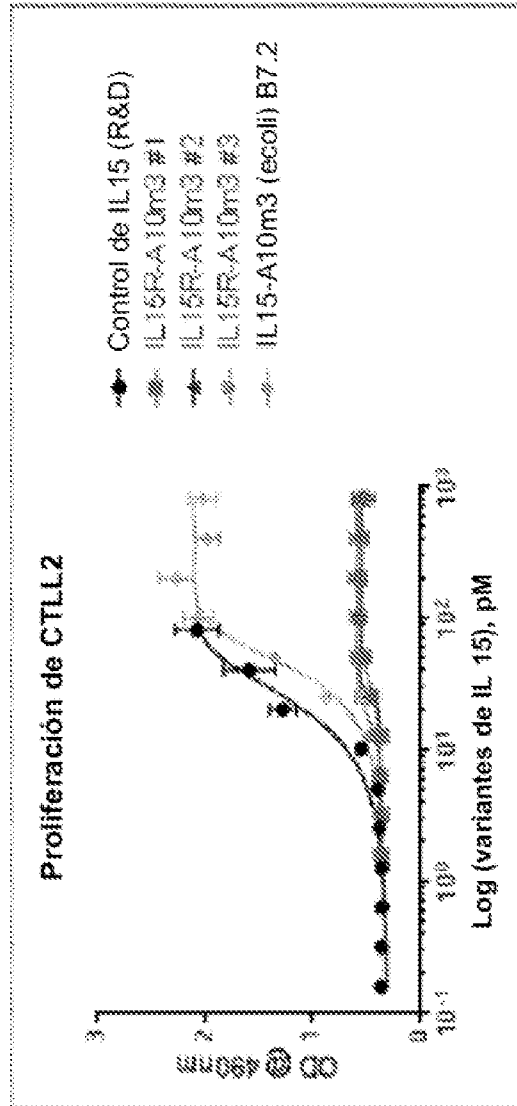


Figura 12A

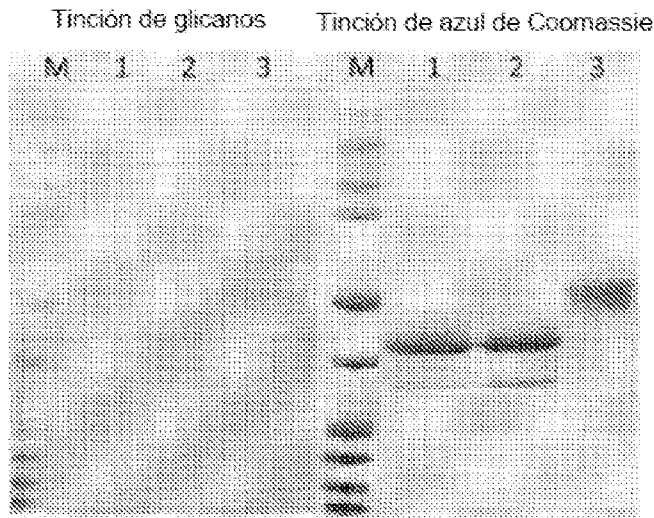


Figura 12B

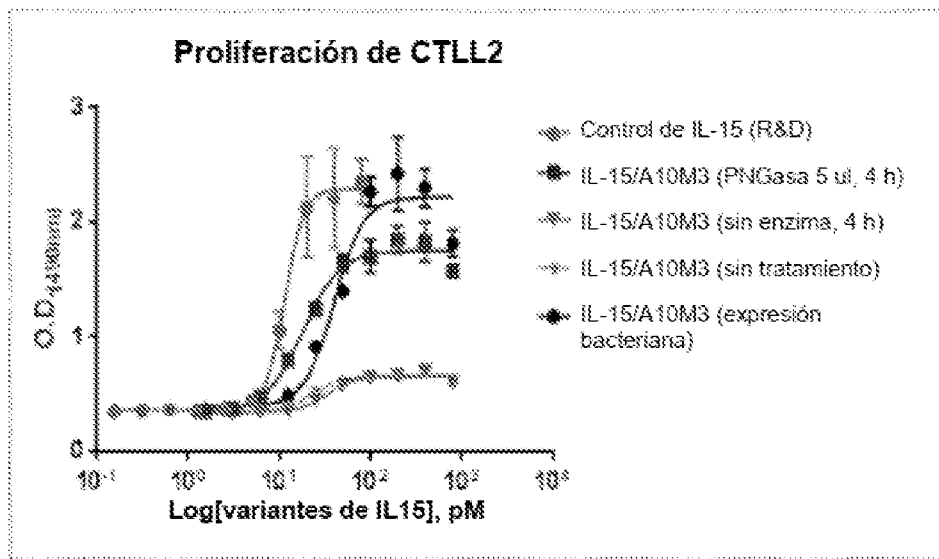


Figura 13A

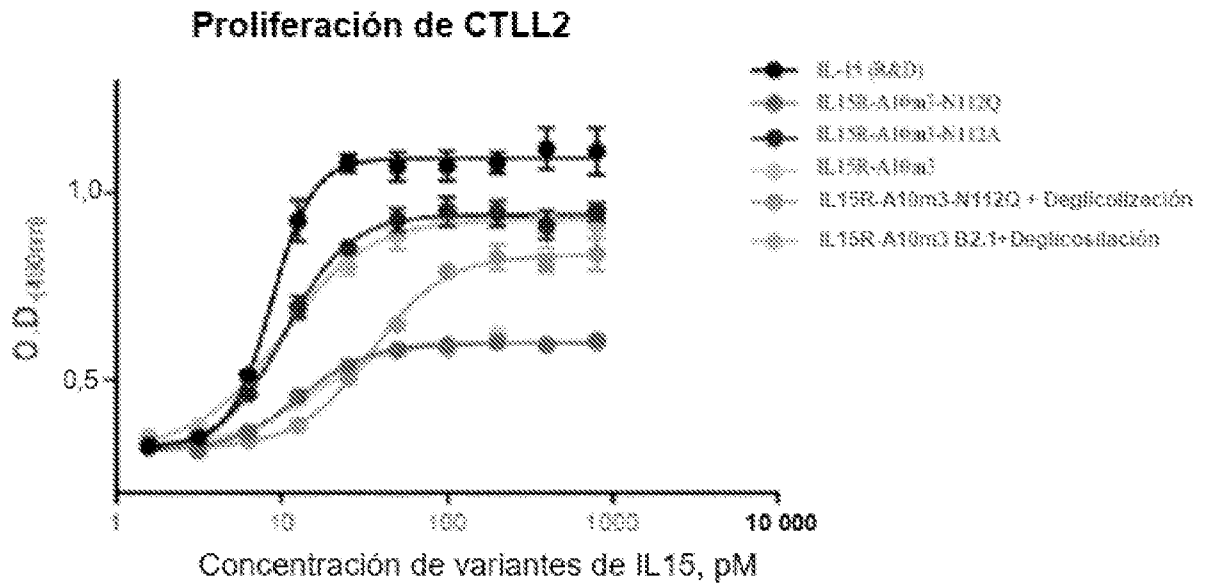


Figura 13B

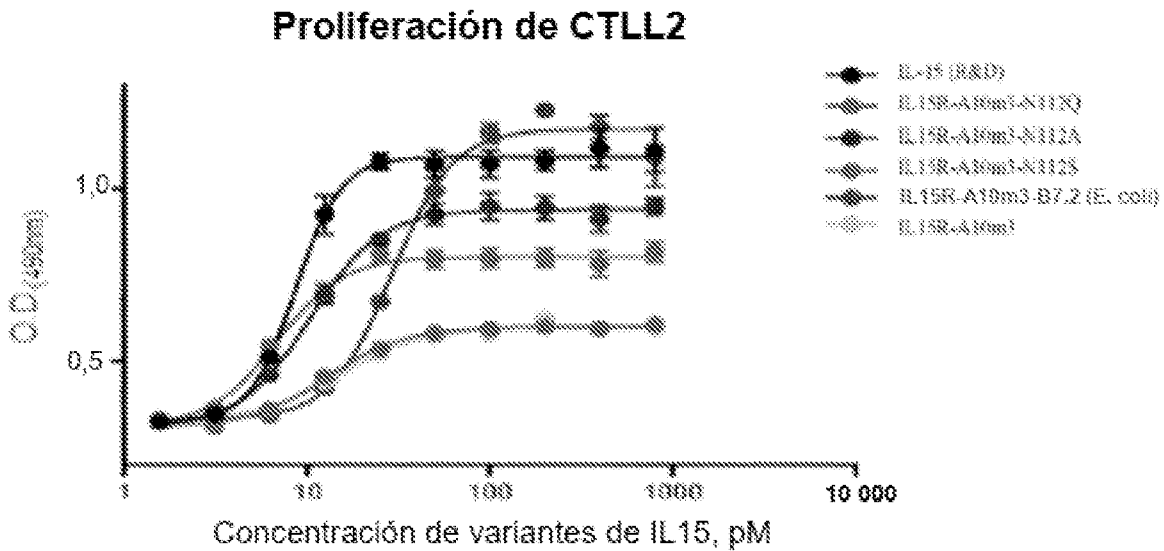
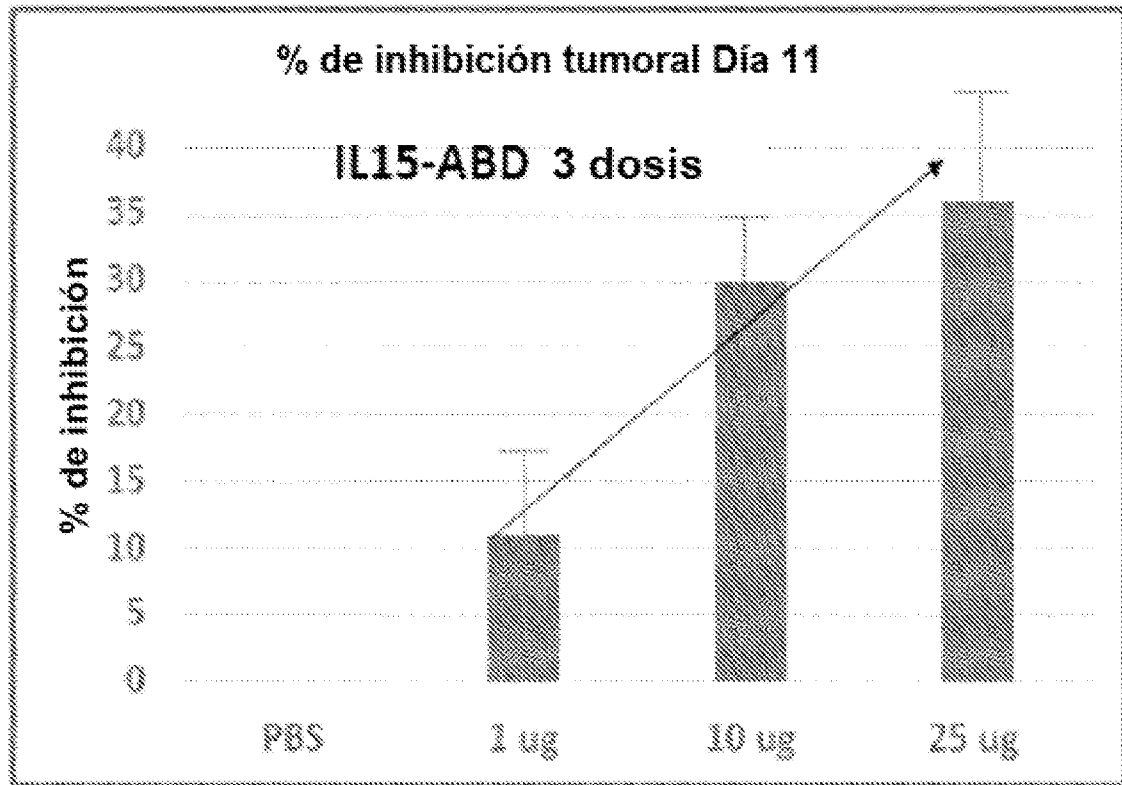


Figura 14

Tiempo para IV [6 ratones por cada grupo] N=30		T=5 ? día ~50 mm ³	Día 7	Día 9	Día 11	Día 14 Final?
1	Placebo	PBS	"	"	"	Peso y tamaño del tumor/ homogeneizado y suero
2	IL 15-ABD – 1 ug/ratones	1 ug	1 ug	1 ug	1 ug	Peso y tamaño del tumor/ homogeneizado y suero
3	IL 15-ABD – 10 ug/ratones	10 ug	10 ug	10 ug	10 ug	Peso y tamaño del tumor/ homogeneizado y suero
4	IL 15-ABD – 25 ug/ratones	25 ug	25 ug	25 ug	25 ug	Peso y tamaño del tumor/ homogeneizado y suero
		Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	dosis cada 48 horas
Final						

Figura 15



Tumor establecido de 100 mm³ después dosificación @ 0, 2, 4 días

Figura 16

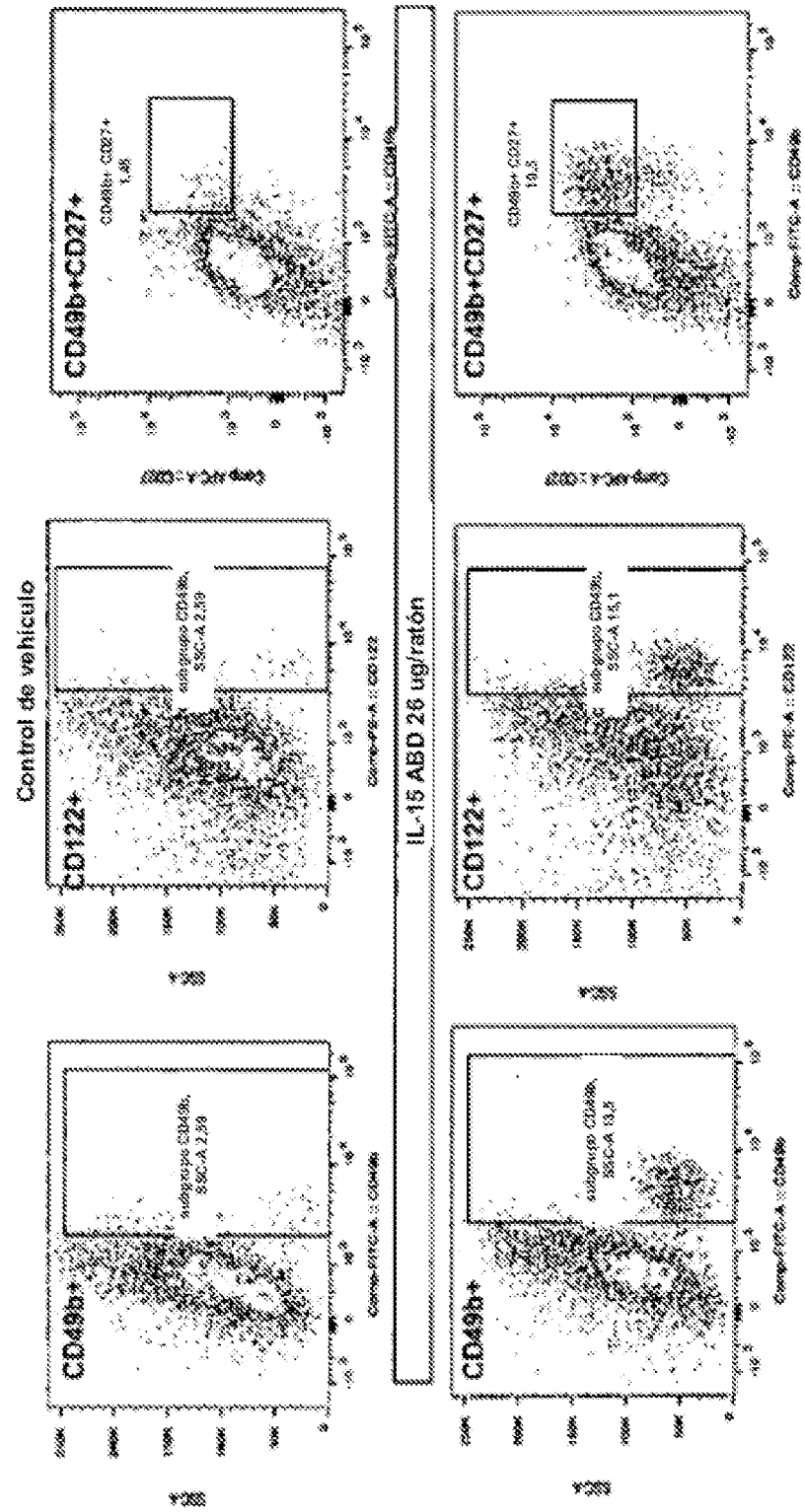
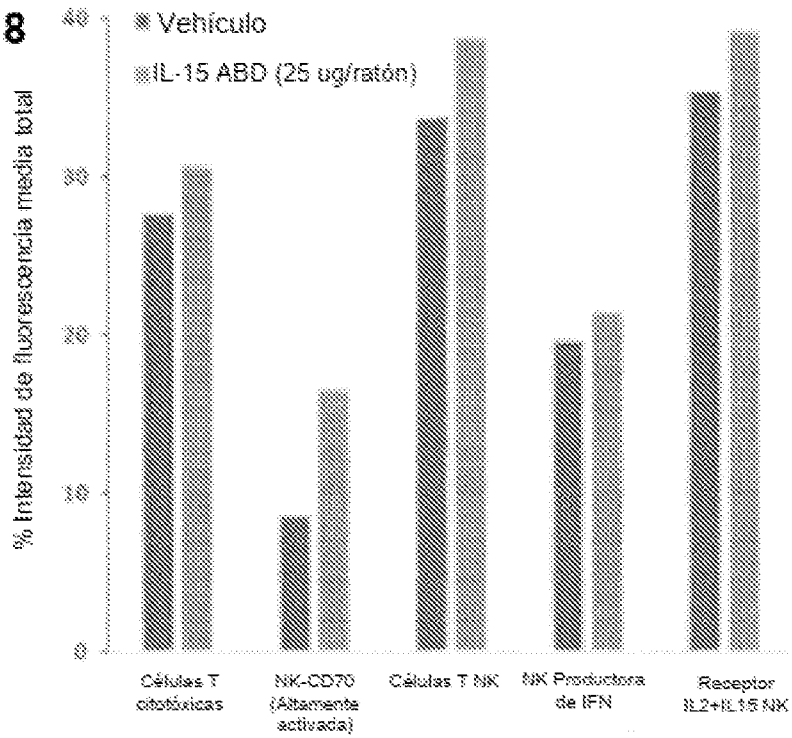


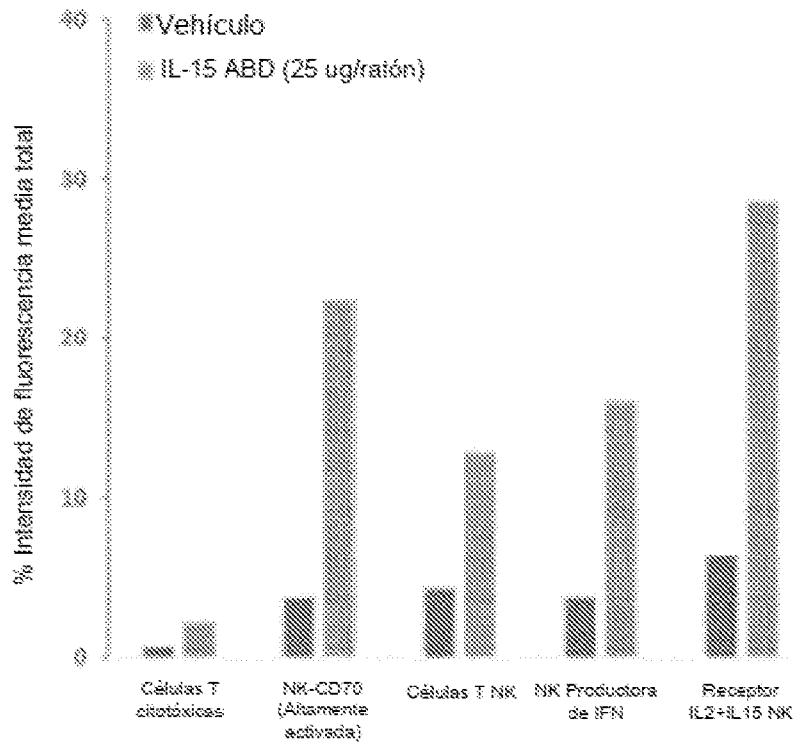
Figura 17

ID de muestra	Tejido	Tratamiento	Células vivas	CD45+CD3+	CD45+CD3+ CD45+CD3+	CD45+CD3+ CD45+CD3+	CD27+	Mediana de CD27	CD49b	Mediana de CD49b	CD49b+	Mediana de CD122	NK-CD70 altamente activas		NK productora de INF	% de NK	
													Célula T citotóxica	Células NK			
31	Bazo	Vehículo	94	32,6	57,6	14,5	14	68 608	35,4	38 208	20,3	48,5	46 592	%	%	%	%
32			94,6	29,1	67,4	11,7	5,3	33 600	34,9	30 208	20,4	30,2	29 184				
33			92,5	21	63,3	13,5	6,17	36 288	30,8	31 808	18,2	27,5	30 484				
		Media	93,7	27,6	62,8	13,2	8,5	46 153,3	33,0	33 408,0	19,6	35,4	35 413,3				
34		IL-15 ABD 25 ugratón	92	30,6	59	12,9	19	91 264	35,1	62 720	20	36	66 368	%	%	%	%
35			93,2	29,7	63,4	17,2	11,8	54 848	37,3	44 224	19,6	38,3	44 082				
36	94,1		31,6	63,4	17,8	18,7	60 672	43,8	46 464	24,7	44,9	46 912					
	Media	93,1	30,6	61,9	16,0	16,5	68 928,0	38,7	51 136,0	21,4	39,1	52 437,3					
37	Tumor	Vehículo	38,6	0,6	3,1	81,2	3,9	120 788	3,1	128 832,0	5,0	5,8	129 216	%	%	%	%
38			31,2	0,6	1,4	77,3	4,6	80 640	6,3	42 304,0	4,2	6,7	65 472				
39			37,6	0,7	3,6	63,9	3,0	152 320	3,6	172 544,0	2,3	4,9	158 400				
		Media	36,1	0,7	2,7	74,1	3,8	117 909,3	4,3	114 560,0	3,6	6,4	117 086,0				
40		IL-15 ABD 25 ugratón	34,3	3,3	2,8	64,4	24,1	99 072	18,1	55 616,0	17,3	32,8	81 024	%	%	%	%
41			31,1	3,0	3,0	73,4	31,0	109 888	11,4	59 712,0	20,6	35,8	112 000				
42	41,1		0,4	0,5	78,6	11,6	102 720	8,8	53 632,0	10,3	17,1	94 976					
	Media	35,5	2,2	2,1	72,1	22,3	103 693,3	12,8	56 320,0	16,1	28,6	96 000,0					

Figura 18



Bazo



Tumor

Figura 19A

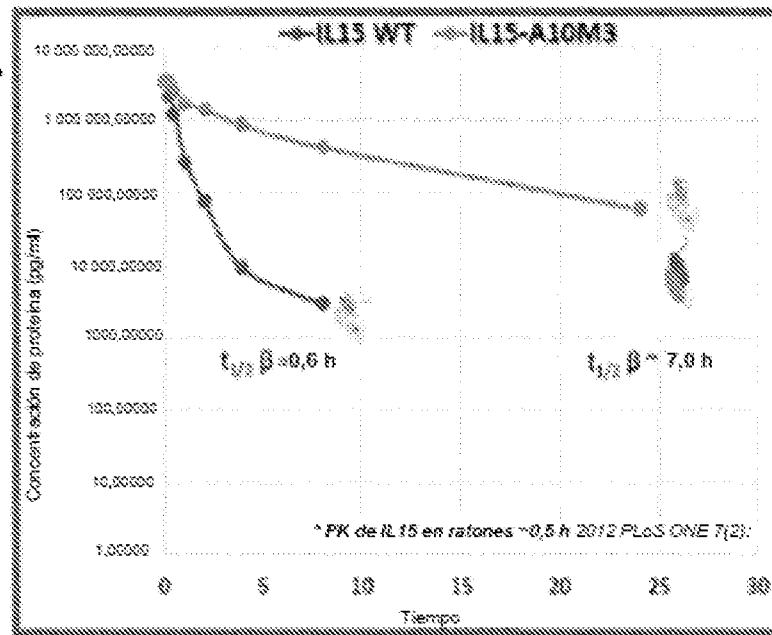


Figura 19B

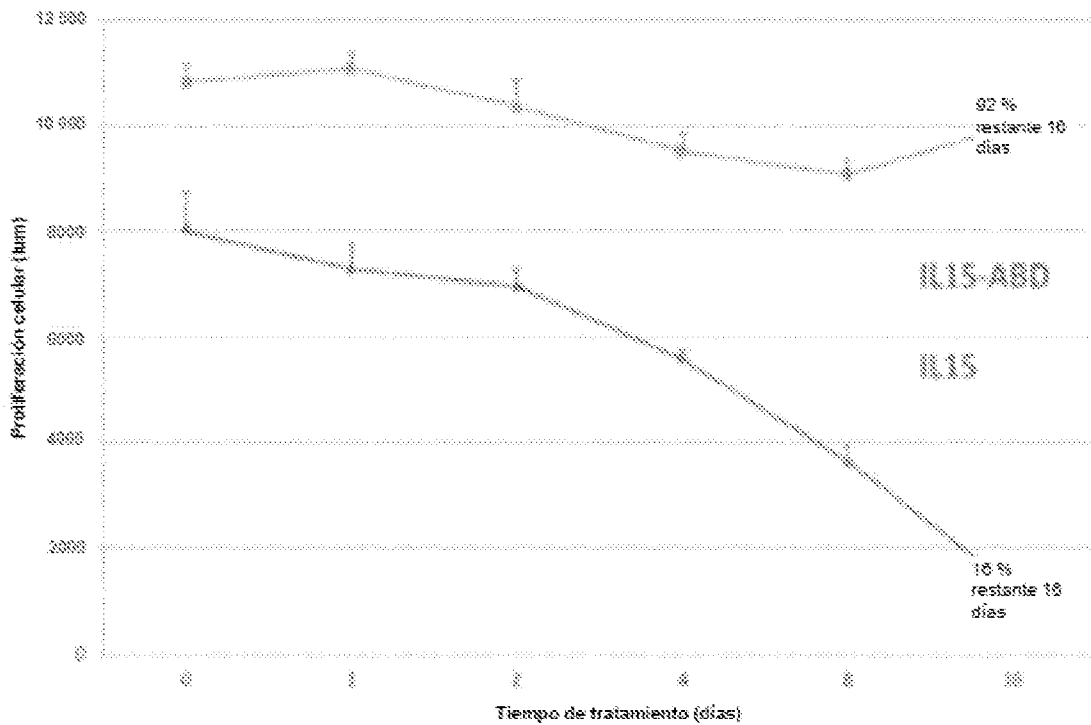


Figura 20

mIL12sc-A10m3

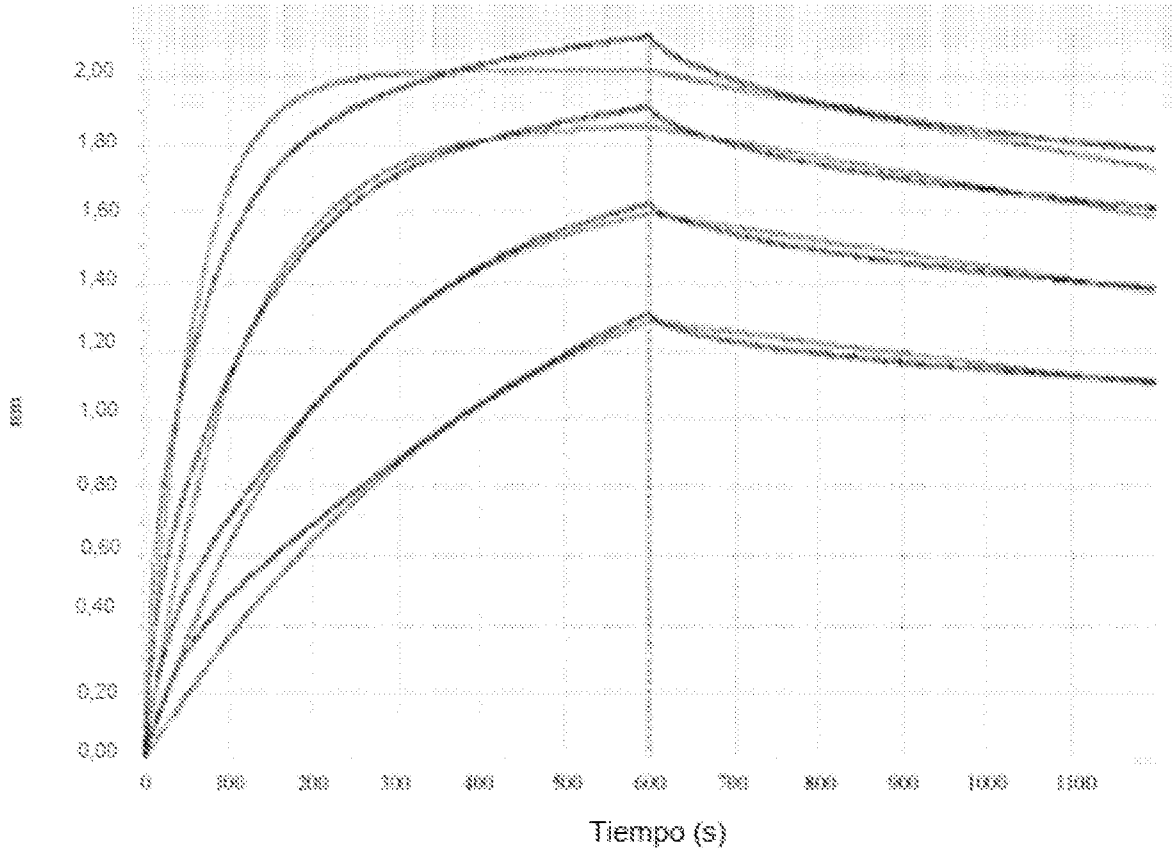
mwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltcdtpeedditwtsdqrhgvigsgkltitvkefldagqytchkggetlshshllhk
kengiwesteilkufknktflkceapnysgrficswlvqrnmldikfniksssspsdravtcgmaslsaekvldqr dyekysvs
cegedvteptaectlpielalearqqnkyenystsfiridiikpdppknlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvri
qrkkekmeteeqcnqkgaflvektstevqckggvvevqaqdryynsscskwaevpcrvrsggsgsgsgsgsgsgsvip
vsgparcIsqsmllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqstflkclplelkhknesclatretsstrgsc lppqktslmmtlclg
siyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgnlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmkclillhafstrvvtinrvm
gylssaGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFD
AVMHWVRQA PGKLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYY
CVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQ
TATITCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAG
DEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

IL-12 humana sc-A10m3

iwekkdvyvvevdwypdapgemvltcdtpeedgitwtidqssevigsgkltiqvkefgdagqytchkggevlshshllhk
kedgiwstdilkdqkepkntflrceaknysgrfiewlittistdltsvkssrgssdpqgvtegaatlsaervrgdnkeyeysv
ceqedsacpaaceslpeivmvdavhllkyenytsffiridiikpdppknlqmkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfc
vqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrknaissvraqdryyssswevasypesGGGGGSmplvatpdpgmfpclhhs
qallravsnmlqkarqtiefypctseeidbeditkdkstveaciplelkhknesclnsretsfitngsc lasrkttsfmmalc lssiyedlkmy
qvefktmnaclimdpkrqifldqnmlavidelmqalnfnsetvpqksslecpdfyktkikclillhafiravtidrvtsylnasGGGG
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFD DAVMHWVRQA
PGKLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSN
RGAFAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGG
NIGTKSVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV
WDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 21A

Vista de ajuste



Octet-miL12-A10m3 B01 MSA pH 7,21-13-2016

ID de muestra	Conc. (nM)	Respuesta	KD (M)	R ² completo
IL 12-A10 Lote 1.1 pH 7,2	143,7	2,1168	2,13E-09	0,986517
IL 12-A10 Lote 1.1 pH 7,2	71,8	1,9091	2,13E-09	0,986517
IL 12-A10 Lote 1.1 pH 7,2	35,9	1,6242	2,13E-09	0,986517
IL 12-A10 Lote 1.1 pH 7,2	18	1,3016	2,13E-09	0,986517

KD+2,1 nM

Figura 21B

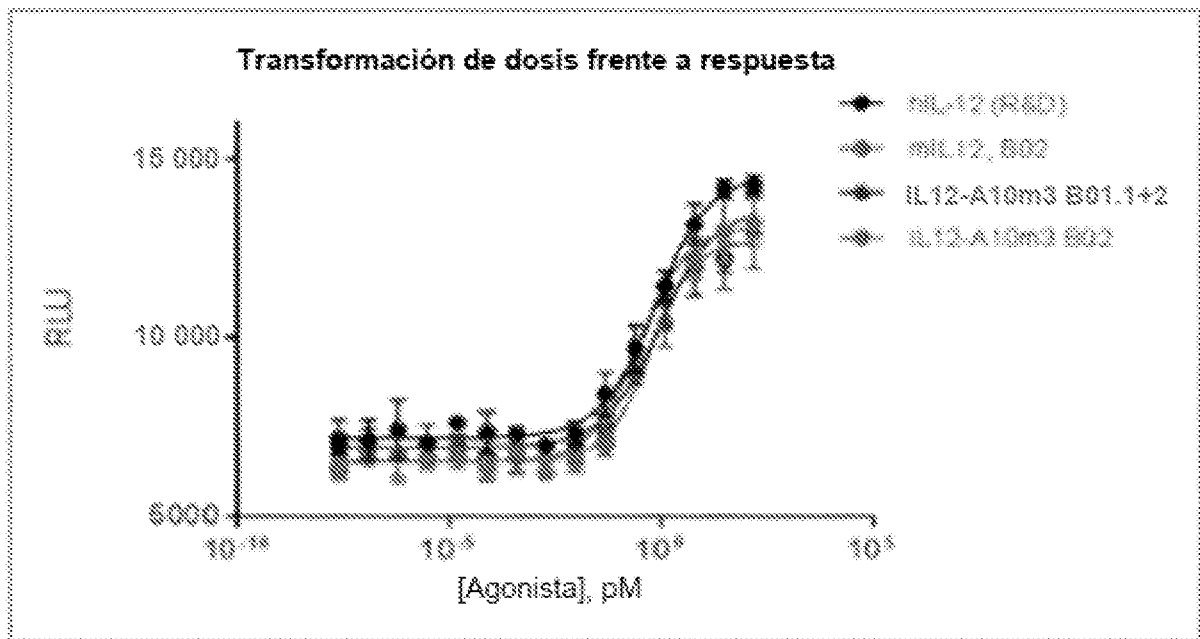


Figura 22

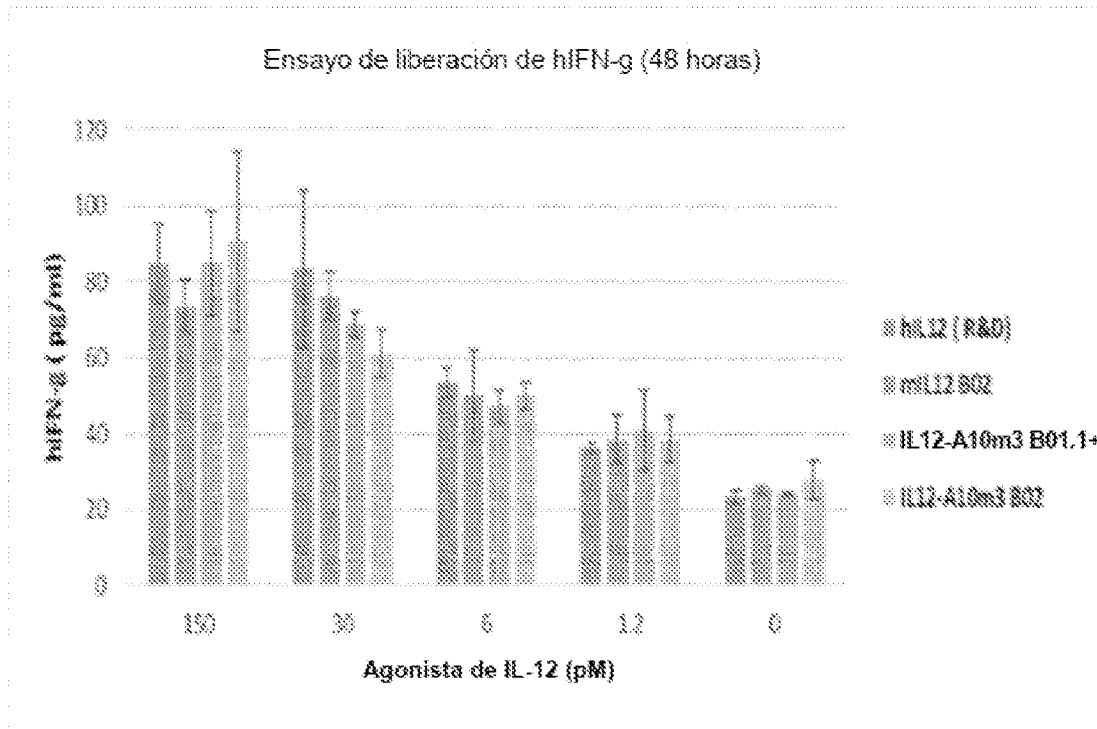


Figura 23

Grupo	Tratamiento	Animales por grupo	Esquema de dosis y vía	Retirar a las 24 h después de la dosificación	Monitoreo del crecimiento tumoral y el peso corporal	Hacia fin del estudio
1	Placabo	9 ratones*		3 ratones*		
2	IL12 (3 ug)	6 ratones				
3	IL12-ABD (4,5 ug)	6 ratones	7 días después de la inoculación del tumor (tumor ≈ 100 mm ³)			
4	IL12 (10 ug)	6 ratones				
5	IL12-ABD (15 ug)	6 ratones				
6	IL12 (20 ug)	9 ratones*		3 ratones*	Cada 2 días	Monitorear el crecimiento del tumor diariamente hasta que el 50 % de tumores en el último grupo restante alcance 2000 mm ³ .
7	IL12-ABD (30 ug)	9 ratones*		3 ratones*		

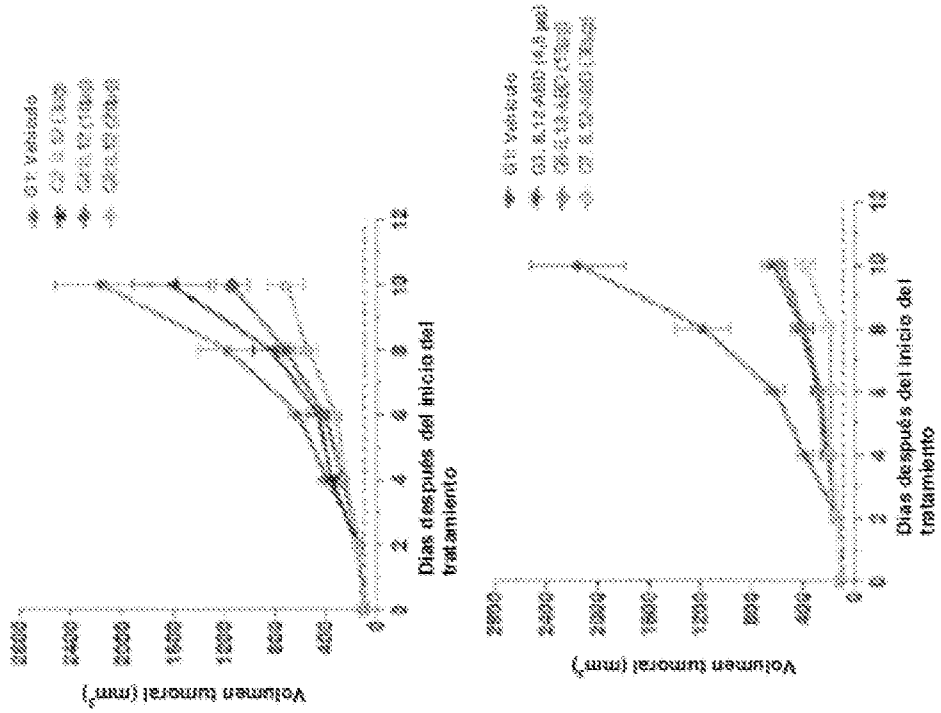


Figura 24B

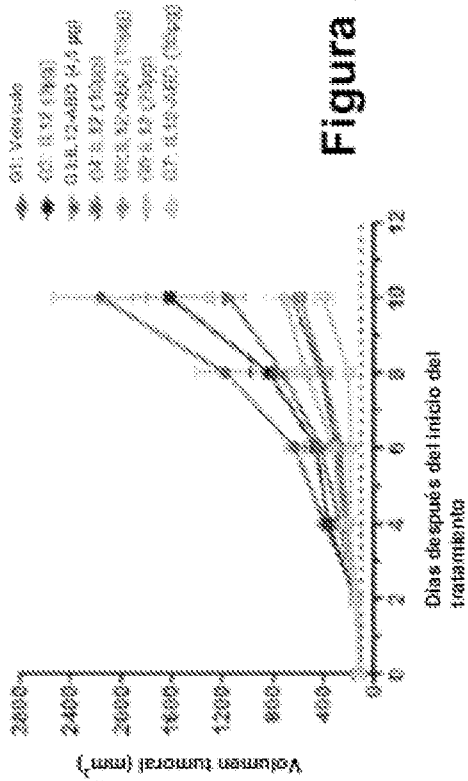


Figura 24A

Figura 24C

Figura 25

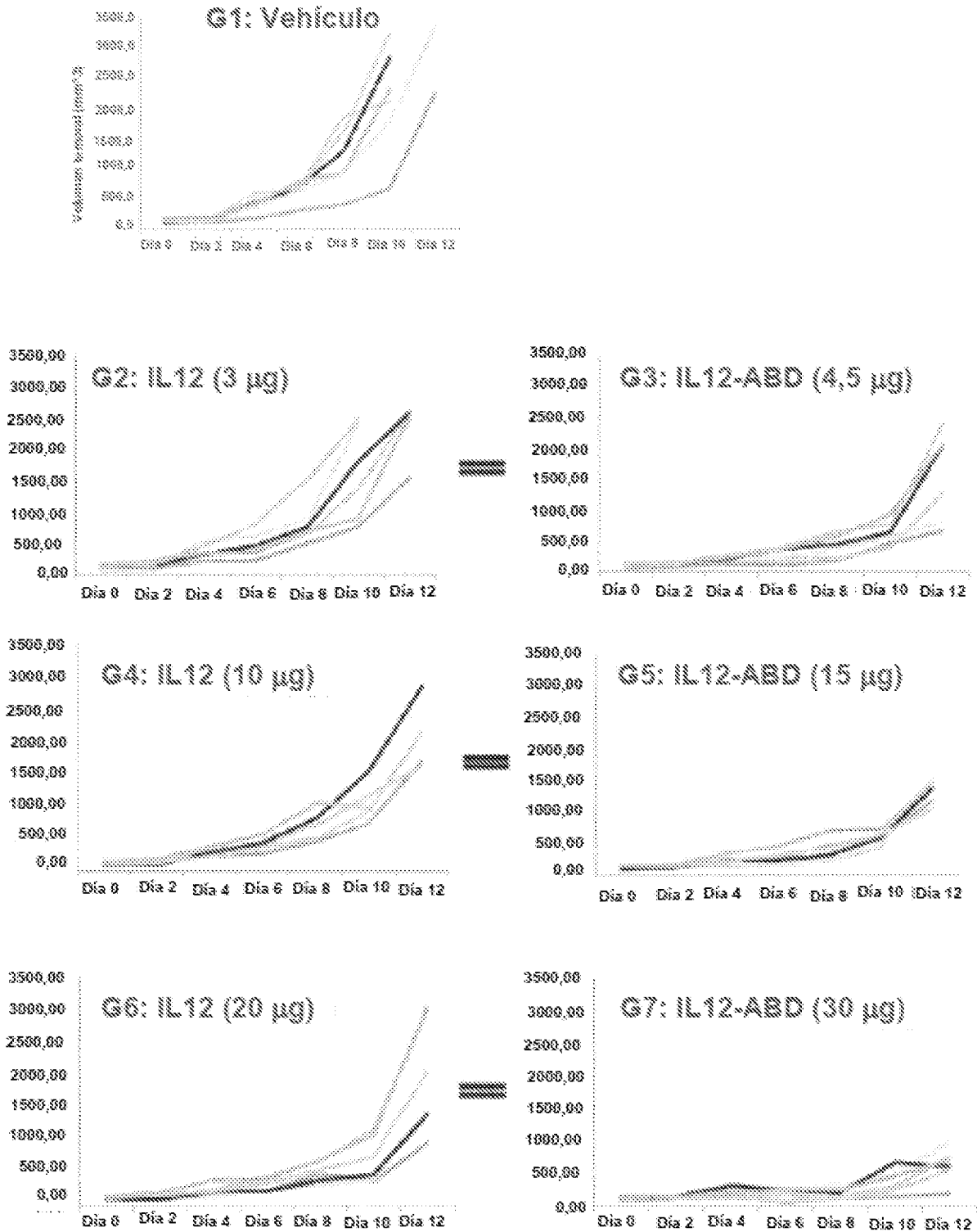


Figura 26A

Volumen tumoral el día 10

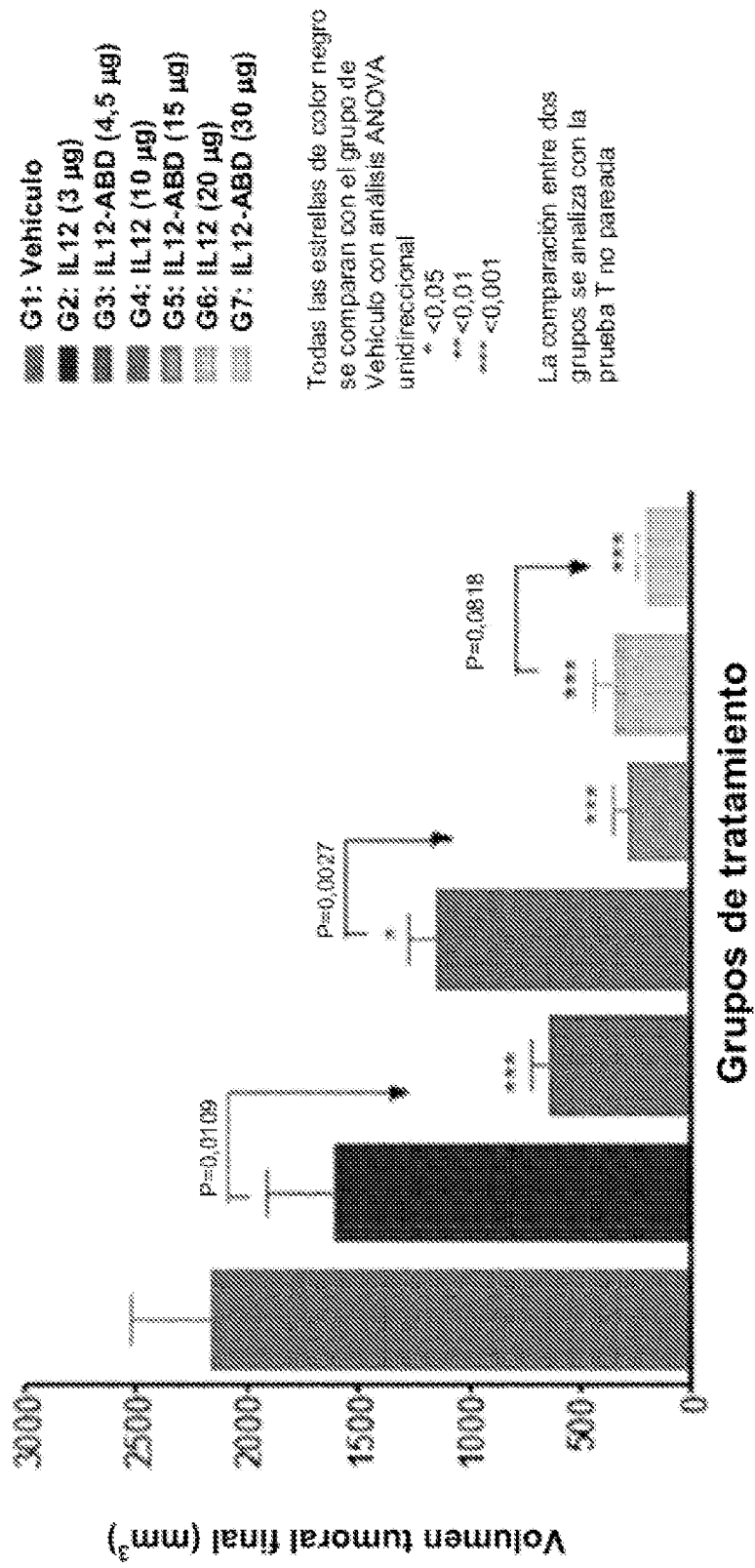


Figura 26B

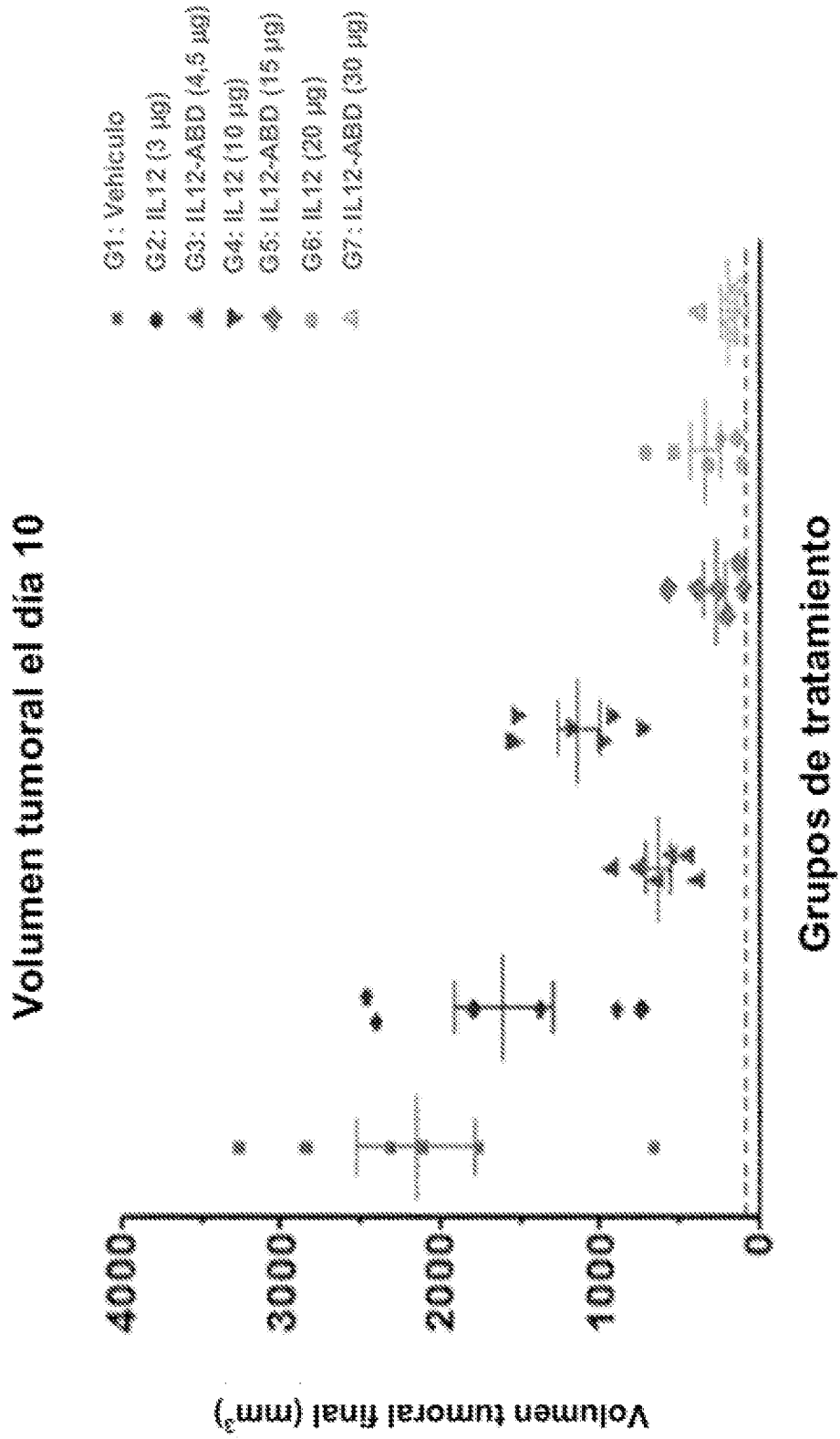


Figura 27

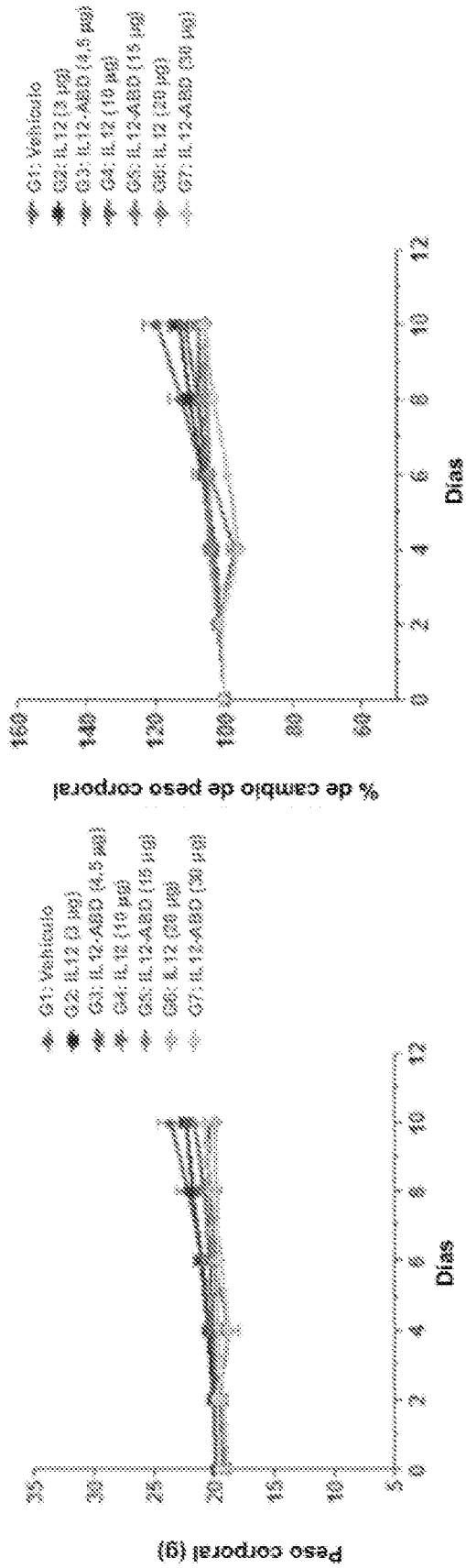


Figura 28

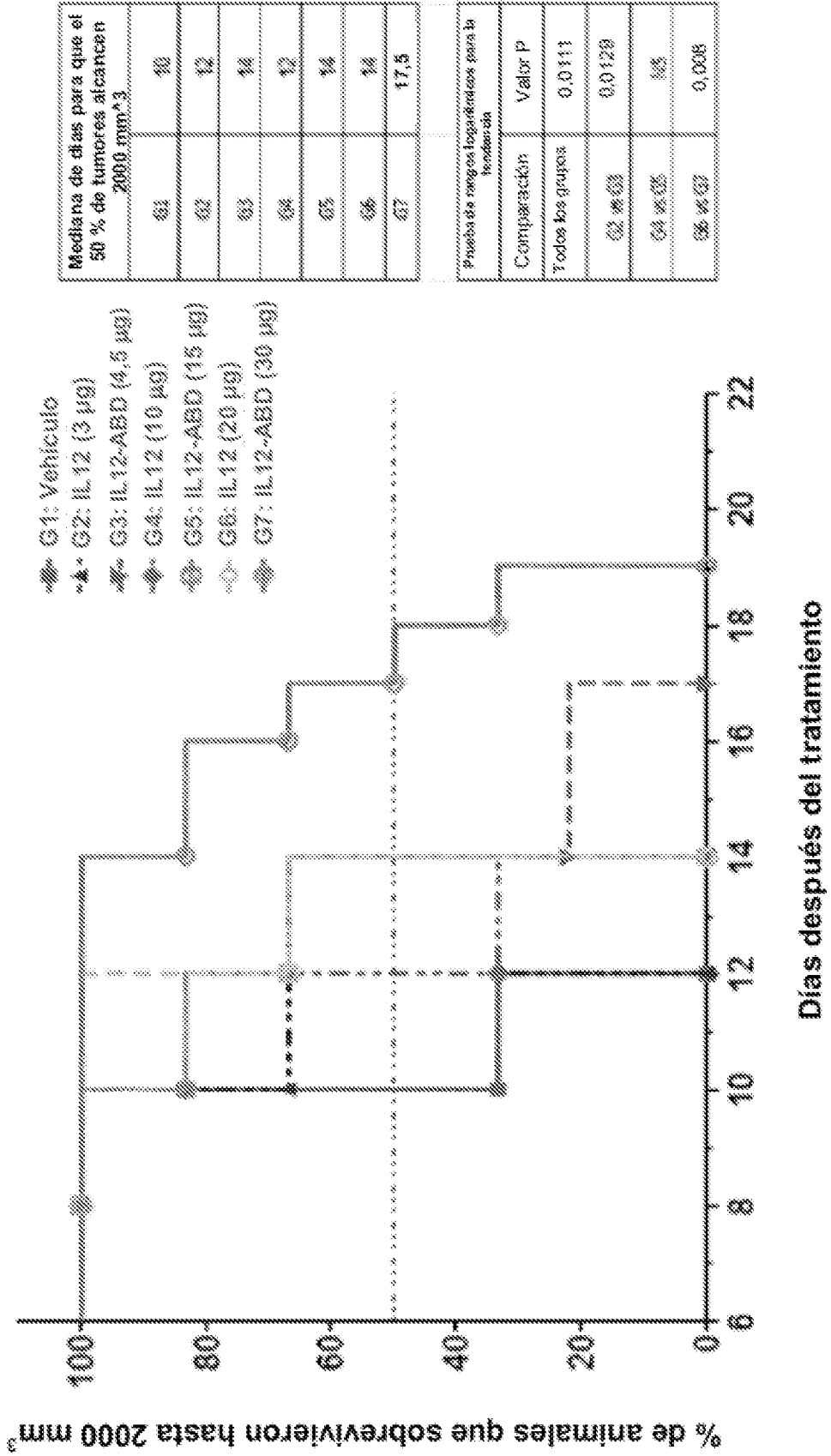


Figura 29
Comparación de los efectos farmacodinámicos de IL12-ABD e IL12 @ 5 días
después de la dosis única en portadores de tumor B16-F10 (100 mm³)

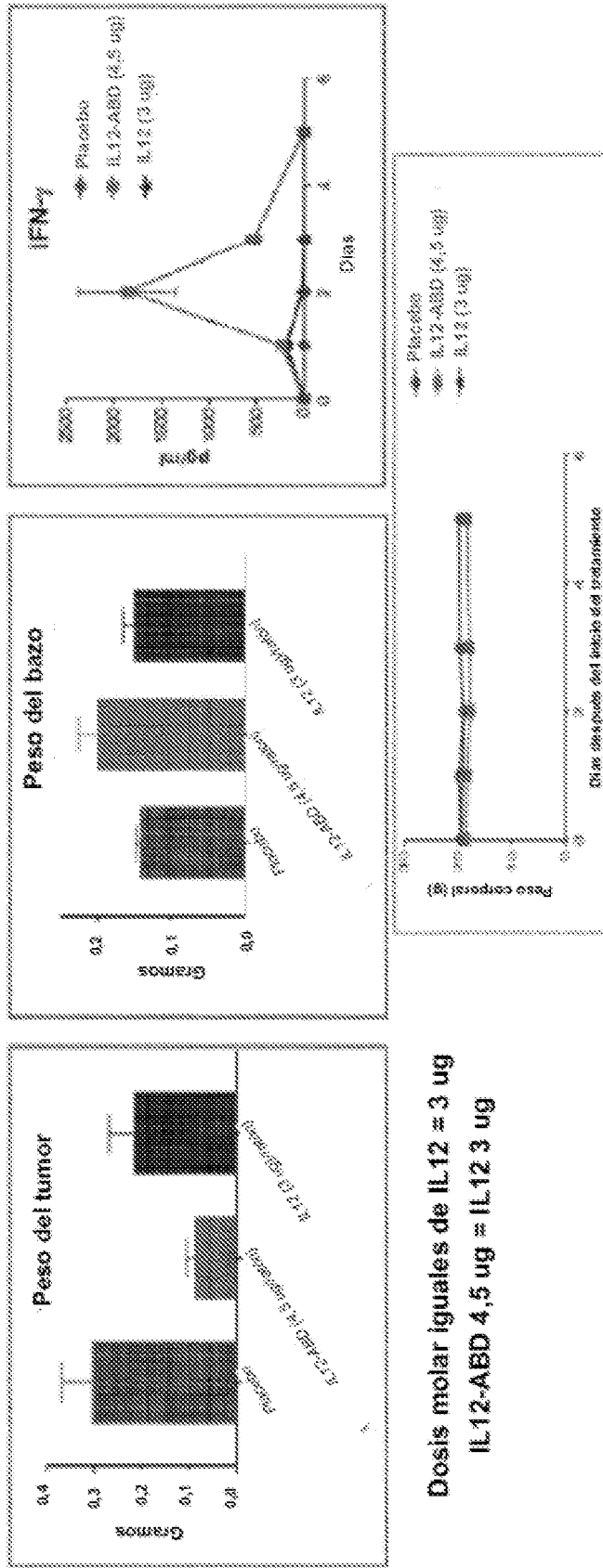


Figura 30

Evaluación de la dosis única (SD) de IL12-ABD (1,3 ug) frente a IL12 (30 ug) en melanoma B16F10 (establecido @100 mm³, n=8)

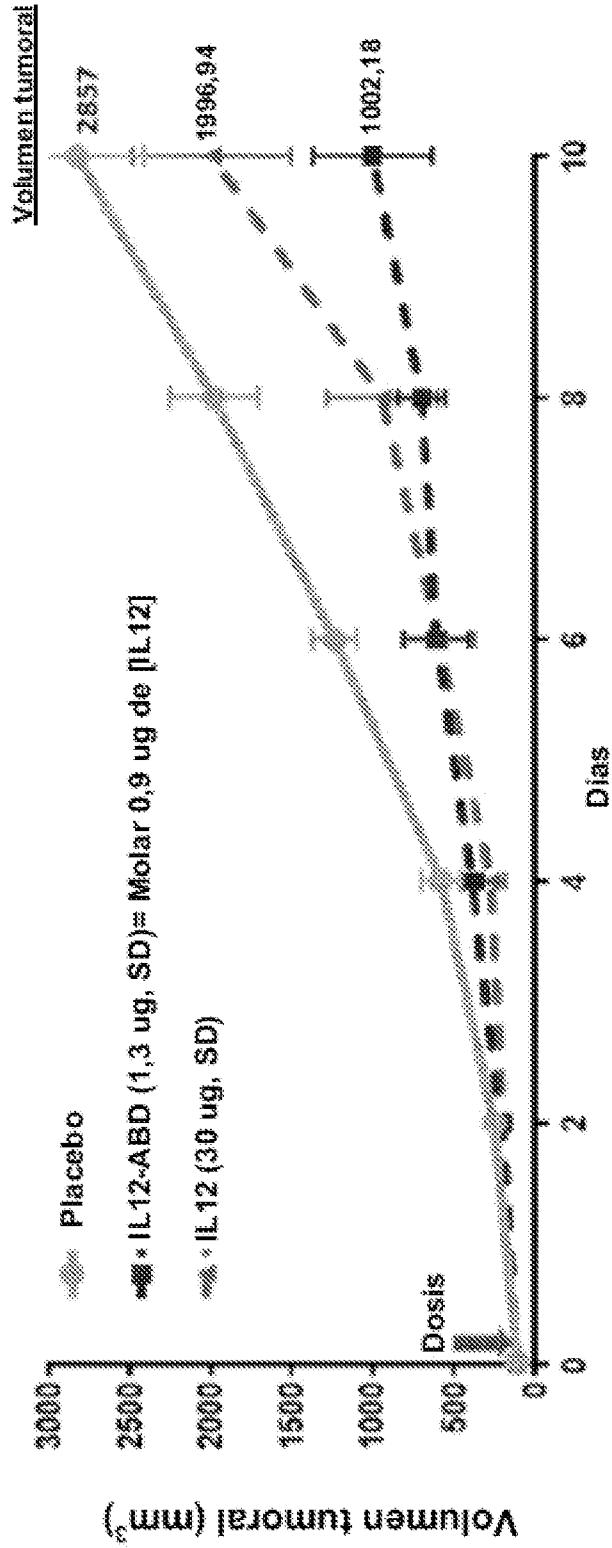


Figura 31

Comparación de los efectos hematopoyéticos de IL12-ABD (1,3 ug) e IL12 (30 ug) en los días 3 y 7 después de la dosis única en portadores de tumor B16-F10 (100 mm³)

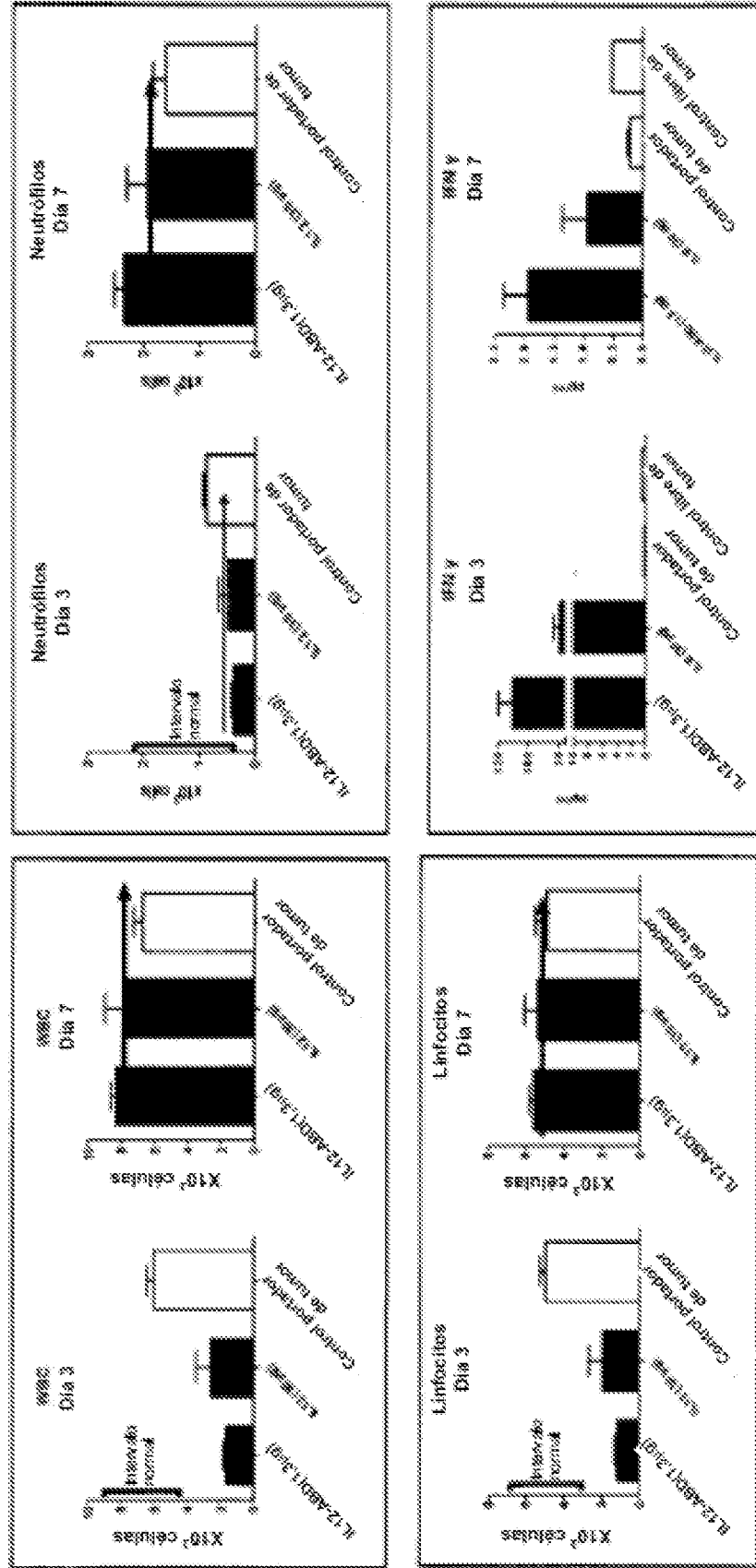


Figura 32

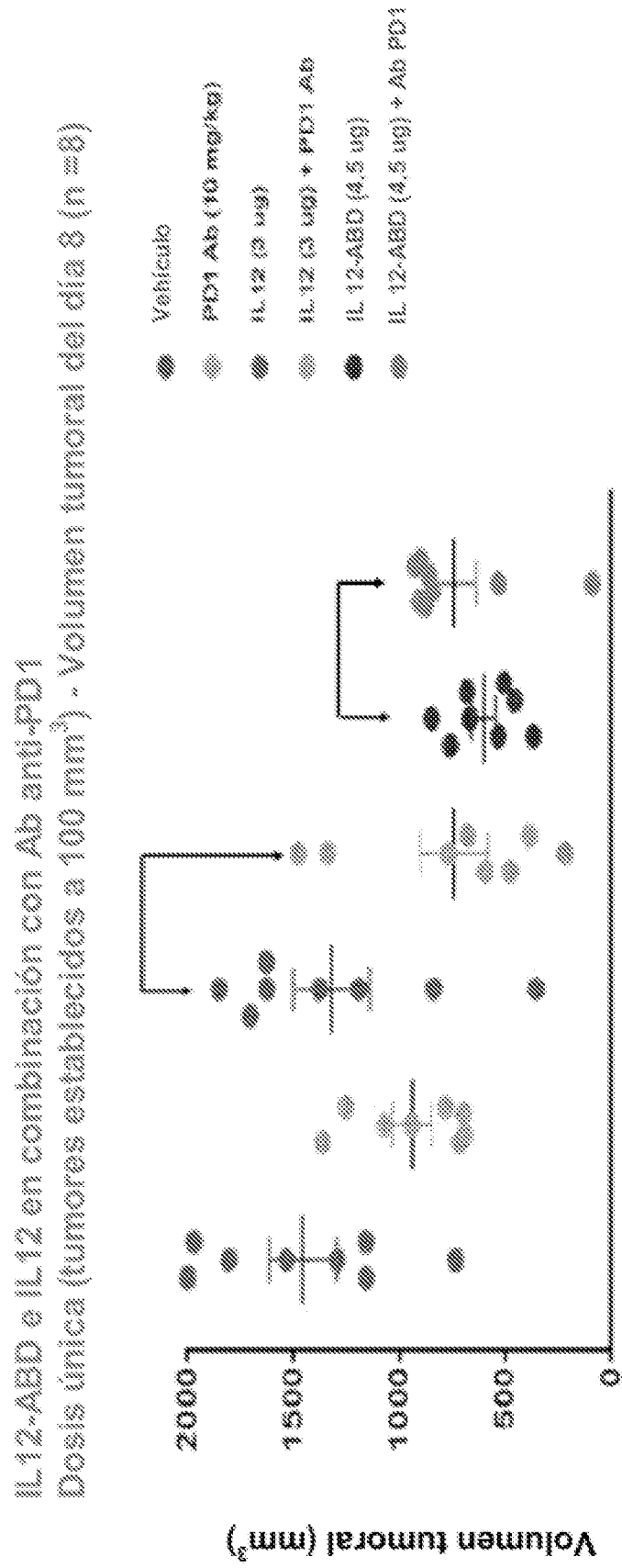


Figura 33

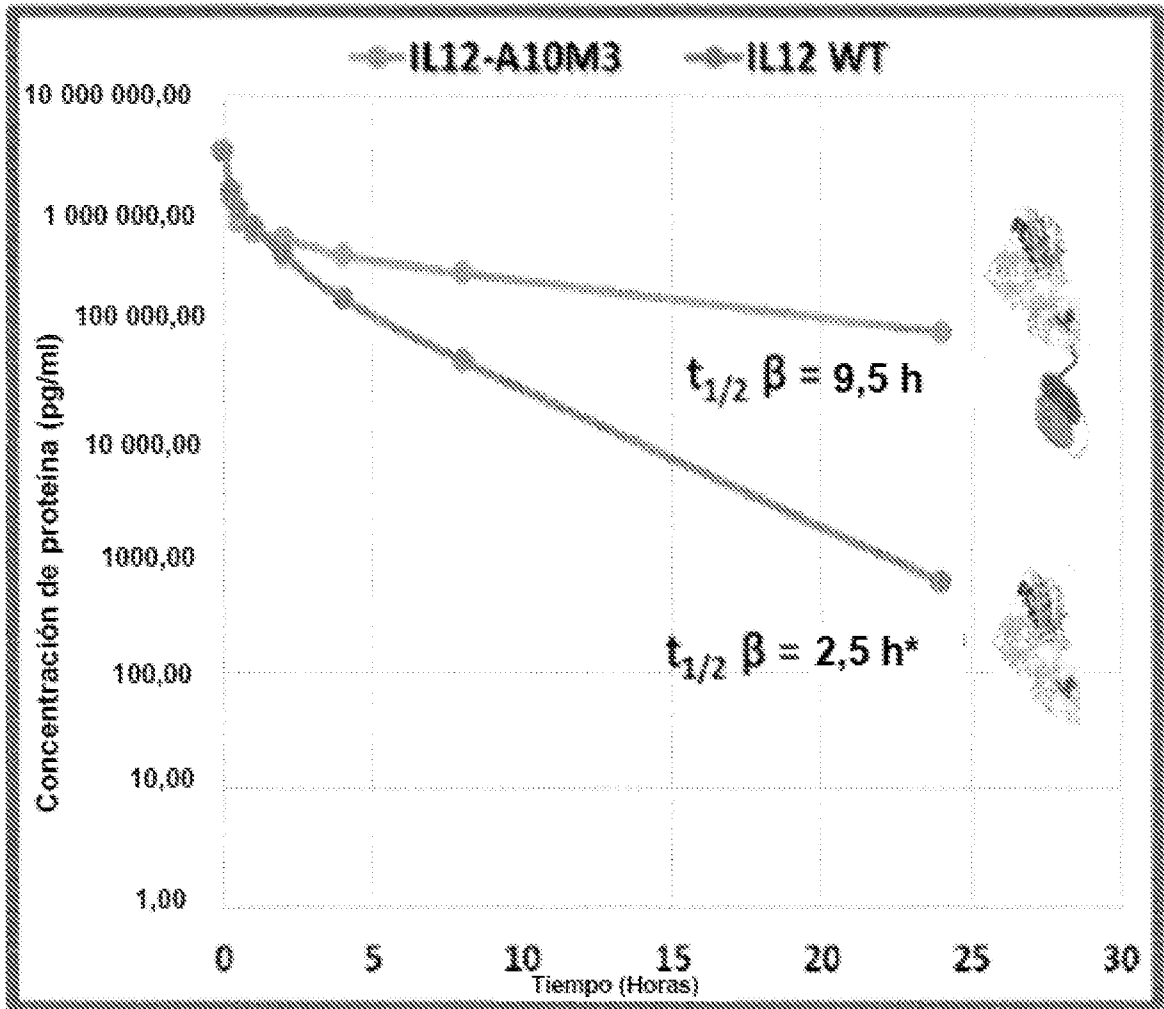


Figura 34

mIL15RA-A10m3-mIL-12sc

nwvvisdflkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvvislesgdasihdvtenlilannslsngnvtsgcreceeleeknikelfl
 qsfvhiivqmfiatsGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITPDD
 AVMSWVFRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLY
 SNPRGGAFDINGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGVHSSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNIGT
 KTSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIFPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLW
 VFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnlctdtpeeddit
 wtdqqrhgvigsgkthitvkeflidagqytchkggetlshshllhkkkengiwsteilkknfkaktkfkecapnysgrfteswlvqnrmdlknfi
 ksssspsdravtegmashaekvldqrdyeykysvscqedvtcptaectplielalearqqnknyenystsfirdiikpdppknlqmkplk
 nsqvevsweyepdswstphsyfskffvriqrkkekemketeegenqkgaffvektstevqekggvncvqaqdrynsscskwacvperv
 rsgggsgggsgggsvripvsgparclsqmllktddmvtarekikhysctaedidheditrdqstlktclplelhnescelatretsstgscf
 ppqktslmmtlcigsyiedlkmqtefqainaalqnhhqqjildkgmlvaidelmqslnhnggetlrqkppvgeadpyrvkmkclilhafstrv
 tinrvmgylssa

mIL-12sc-A10m3-mIL15R

mwelekdvyvvevdwtpdapgetvnlctdtpeedditwtdqqrhgvigsgkthitvkeflidagqytchkggetlshshllhkkkengiw
 teilkknfkaktkfkecapnysgrfteswlvqnrmdlknfiksssspsdravtegmashaekvldqrdyeykysvscqedvtcptaectpl
 elalearqqnknyenystsfirdiikpdppknlqmkplknsqvevsweyepdswstphsyfskffvriqrkkekemketeegenqkgaffv
 ektstevqekggvncvqaqdrynsscskwacvpervrsgggsgggsgggsvripvsgparclsqmllktddmvtarekikhysct
 aedidheditrdqstlktclplelhnescelatretsstgscippqktslmmtlcigsyiedlkmqtefqainaalqnhhqqjildkgmlvaidel
 mqslnhnggetlrqkppvgeadpyrvkmkclilhafstrvvinrvmgylssaGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQ
 LVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITPDDAVMSWVFRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDN
 NAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDINGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGVHSS
 SYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNIGT KTSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIFPERVSGSNSGNTA
 TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSm
 wvevisdflkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvvislesgdasihdvtenlilannslsngnvtsgcreceeleeknikelfl
 qsfvhiivqmfiats

mIL-12sc-A10m3-mIL15RA

mwelekdvyvvevdwtpdapgetvnlctdtpeedditwtdqqrhgvigsgkthitvkeflidagqytchkggetlshshllhkkkengiw
 teilkknfkaktkfkecapnysgrfteswlvqnrmdlknfiksssspsdravtegmashaekvldqrdyeykysvscqedvtcptaectpl
 elalearqqnknyenystsfirdiikpdppknlqmkplknsqvevsweyepdswstphsyfskffvriqrkkekemketeegenqkgaffv
 ektstevqekggvncvqaqdrynsscskwacvpervrsgggsgggsgggsvripvsgparclsqmllktddmvtarekikhysct
 aedidheditrdqstlktclplelhnescelatretsstgscippqktslmmtlcigsyiedlkmqtefqainaalqnhhqqjildkgmlvaidel
 mqslnhnggetlrqkppvgeadpyrvkmkclilhafstrvvinrvmgylssaGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQ
 LVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITPDDAVMSWVFRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDN
 NAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDINGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGVHSS
 SYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNIGT KTSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIFPERVSGSNSGNTA
 TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSm
 wvvisdflkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvvislesgdasihdvtenlilannslsngnvtsgcreceeleeknikelfl
 qsfvhiivqmfiats

Figura 35A

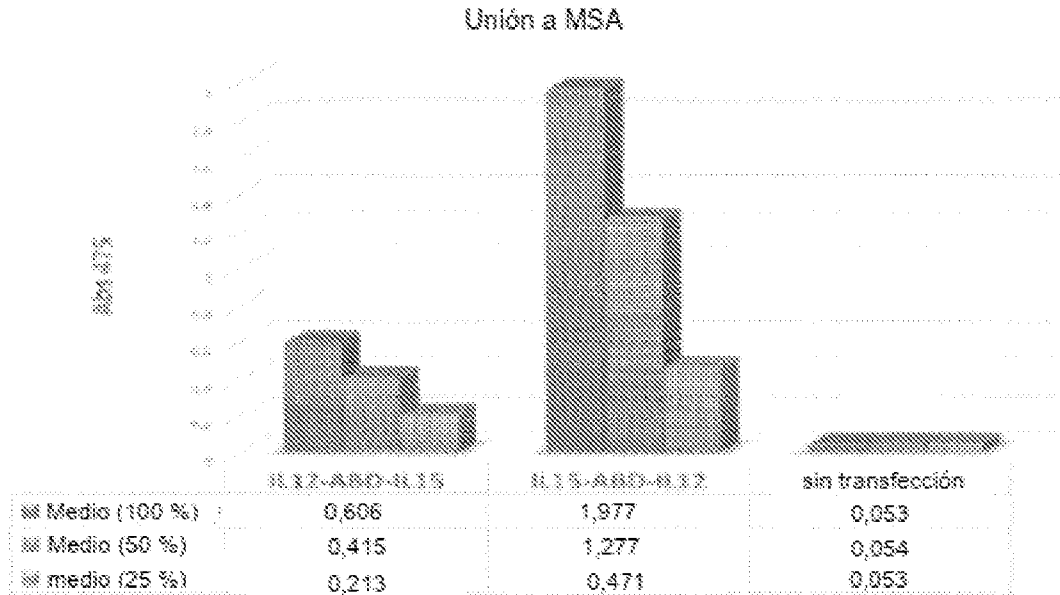


Figura 35B

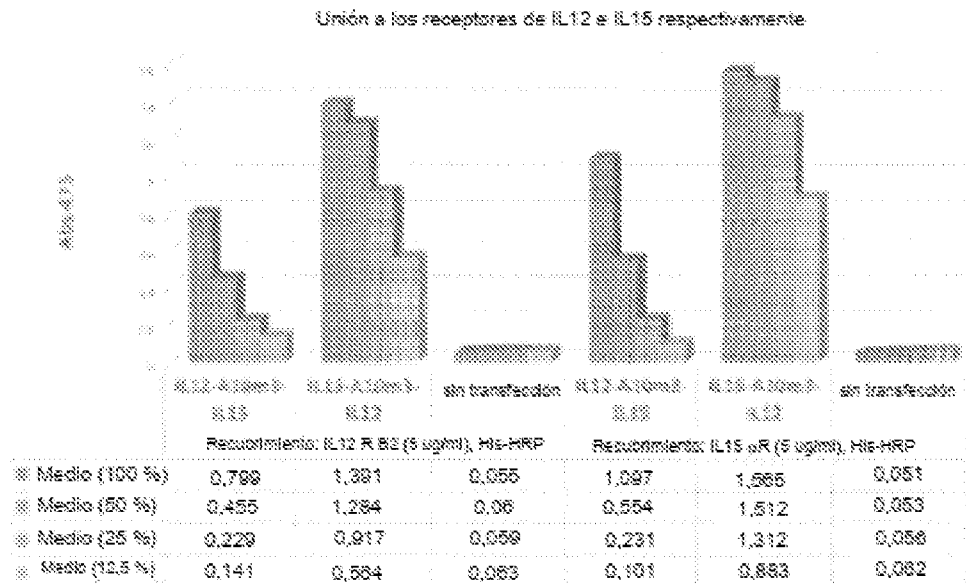


Figura 36

hIL15RA-A10m3-hIL-12sc

nwvvnvisdikkiedliqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllqvislesgdasihdtenliilannsisngnvtsgcreceelecknikefl
qsfvhi vqmfia:GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDD
AVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRPTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVVYCVKGLY
SNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNNIG
TKSVHWYQOKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLW
VFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSiwelkkdvyyvveldwypdaggemvvtcdtpeedgit
wtldqssevlgsgklttiqvkefgdagqytc hkggevlshsllllhkkedgiwstdlilkdqkepka ktfreca knysgrftewwttistdlf
svkssrgssdpqgytgeaatlsaervrgdnkeyeysveccqedsacpaeeslpiev mvdavhklkyenytsffir diikpdppknqkpk
lknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfevqvqgkskrekkdryfdktsatv icerknaasisvraqdryysssweasvpc:GGGG
GSmipvatpdpngmfpclhhsqnliravssmllqkarqtlefypctseeidheditkdkstveacipleltnescinsretsfitngsclsrktsfmm
alcissiyedlkmnyqvefktmnakllmdpkrqifldqnmiavideImqainfnsetvpqkasleepdfyktkikleillhafriravtidrvtsylnas

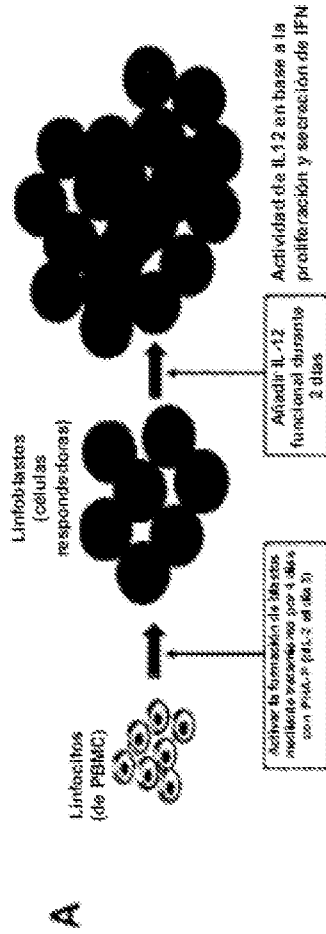
IL-12 humana sc-A10m3-hIL15R

iwelkkdvyyvveldwypdaggemvvtcdtpeedgitwtldqssevlgsgklttiqvkefgdagqytc hkggevlshsllllhkkedgiwst
dlilkdqkepka ktfreca knysgrftewwttistdlfsvkssrgssdpqgytgeaatlsaervrgdnkeyeysveccqedsacpaeeslp
iev mvdavhklkyenytsffir diikpdppknqkpklknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfevqvqgkskrekkdryfdktsatv
icerknaasisvraqdryysssweasvpc:GGGGGSmipvatpdpngmfpclhhsqnliravssmllqkarqtlefypctseeidheditk
dkstveacipleltnescinsretsfitngsclsrktsfmmalcissiyedlkmnyqvefktmnakllmdpkrqifldqnmiavideImqainfnse
tvpqkasleepdfyktkikleillhafriravtidrvtsylnasGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLI
QPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRPTISRDNAKNSLYLQ
MNRLRAEDTAVVYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPS
VSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQOKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEA
GDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSnwvvnvisdikkied
liqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllqvislesgdasihdtenliilannsisngnvtsgcreceelecknikeflqsfvhi vqmfia

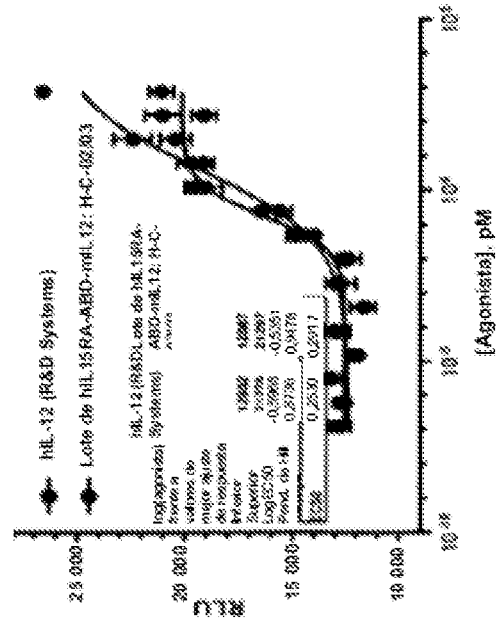
IL-12 humana sc-A10m3-hIL15RA

iwelkkdvyyvveldwypdaggemvvtcdtpeedgitwtldqssevlgsgklttiqvkefgdagqytc hkggevlshsllllhkkedgiwst
dlilkdqkepka ktfreca knysgrftewwttistdlfsvkssrgssdpqgytgeaatlsaervrgdnkeyeysveccqedsacpaeeslp
iev mvdavhklkyenytsffir diikpdppknqkpklknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfevqvqgkskrekkdryfdktsatv
icerknaasisvraqdryysssweasvpc:GGGGGSmipvatpdpngmfpclhhsqnliravssmllqkarqtlefypctseeidheditk
dkstveacipleltnescinsretsfitngsclsrktsfmmalcissiyedlkmnyqvefktmnakllmdpkrqifldqnmiavideImqainfnse
tvpqkasleepdfyktkikleillhafriravtidrvtsylnasGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLI
QPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRPTISRDNAKNSLYLQ
MNRLRAEDTAVVYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPS
VSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQOKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEA
GDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSnwvvnvisdikkied
liqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllqvislesgdasihdtenliilannsisngnvtsgcreceelecknikeflqsfvhi vqmfia

Figura 37



B Ensayo de proliferación de linfoblastos (IL-12)



C Liberación de IFN-γ (IL-12)

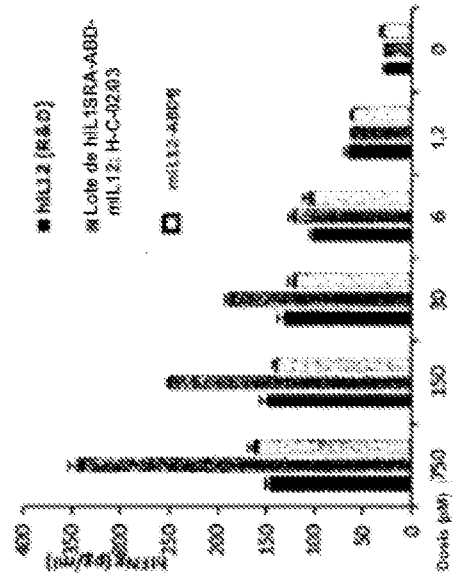
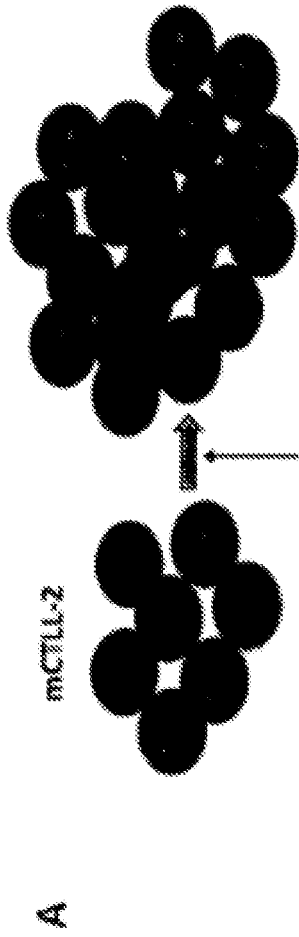


Figura 38



Los linfocitos T citotóxicos CTL-2 son capaces de proliferar en respuesta a IL-15 humana o de ratón

B

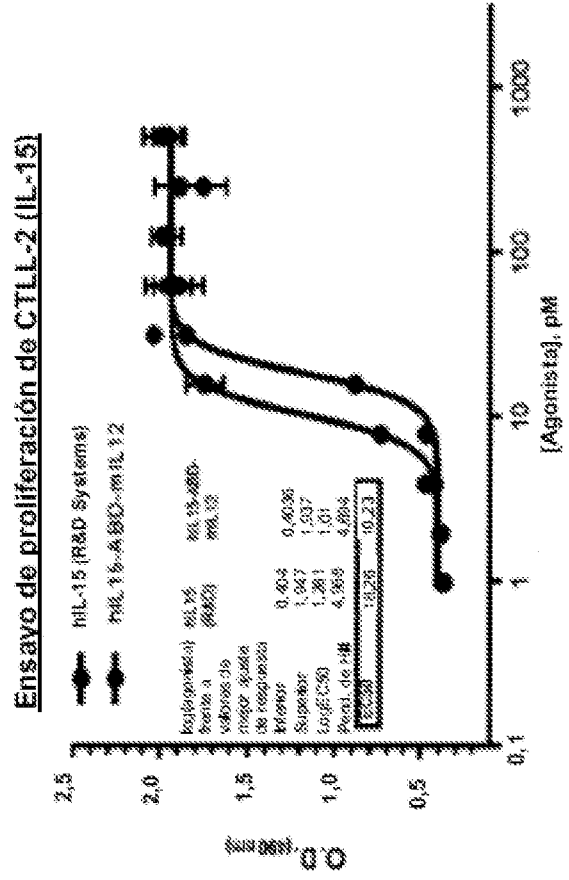


Figura 39

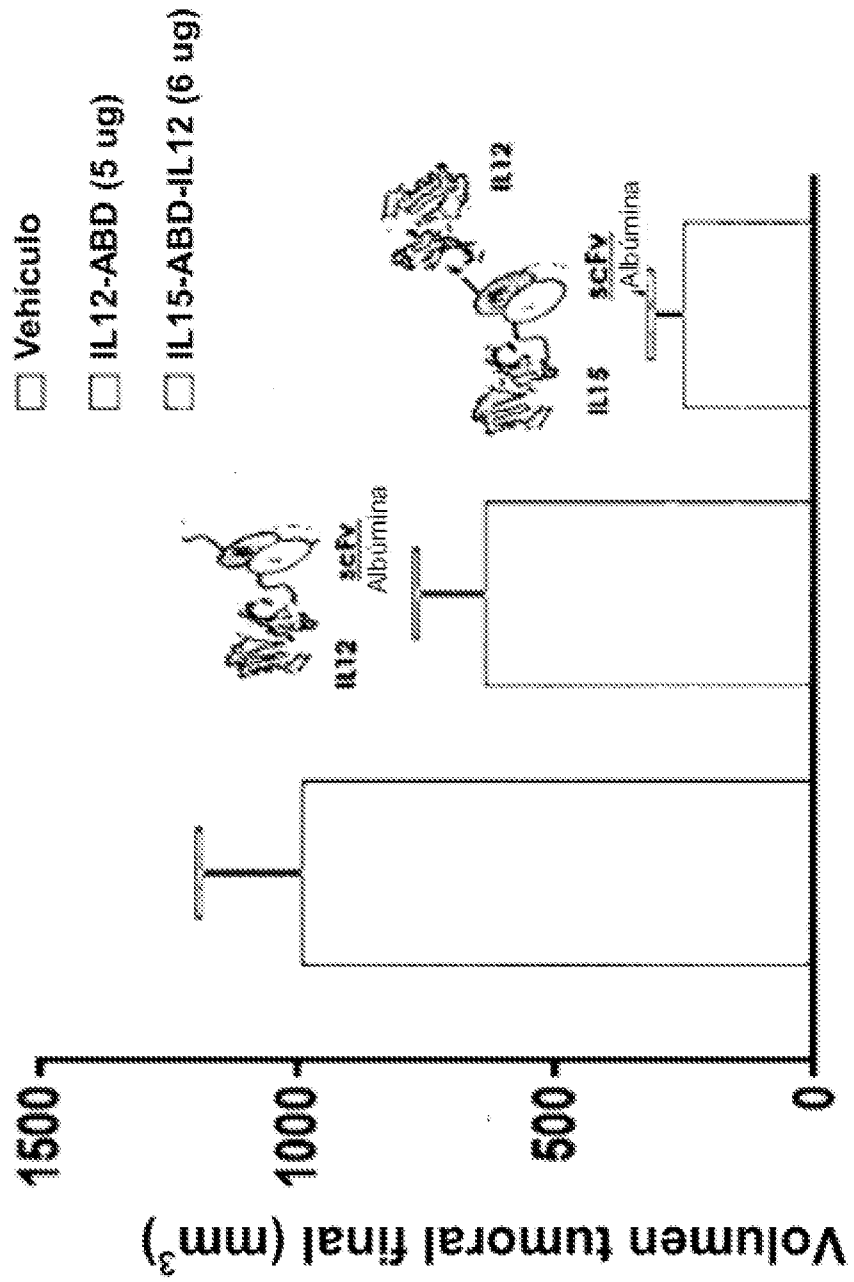


Figura 40A

4H7

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	<p>QVQLVESGGGLVQPKGRSLRISCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDMSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEMRY CSGGSCYPYAYYMDVWGQGTITVSSAST</p>	
Cadena ligera variable (vl)	<p>VHSSSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLIYIG KNNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNLVFEGG GTKLTVLGLGG</p>	
scFv	<p>QVQLVESGGGLVQPKGRSLRISCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDMSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEMRY CSGGSCYPYAYYMDVWGQGTITVSSASTGGGGGGGGGGGGVHSSS ELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLIYIGKNNR PSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNLVFEGGTKLT VLGLGG</p>	

Figura 40B

4D9

	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada variable (vh)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAPGKGLEWVSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYQMINSRAEDTAAYCAKEISGYLG LVAFDIWGQGTMTVSSAST	
Cadena ligera variable (vl)	VHSSYVLTQPLSVSVAPGQTARMTCGGDMVGAKSVHWYQQKPGQAPVLLI YYDHRPSGIPERFSGNSGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDPSSDVFVG GGTQLTVLGLGG	
scfv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYQMINSRAEDTAAYCAKEISGYL GLVAFDIWGQGTMTVSSASTGGGGGGGGGGSSVHSSYVLTQPLSVS VAPGQTARMTCGGDMVGAKSVHWYQQKPGQAPVLLIYYDHRPSGIPERF SGNSGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDPSSDVFVGGGTQLTVLGLGG	

Figura 41

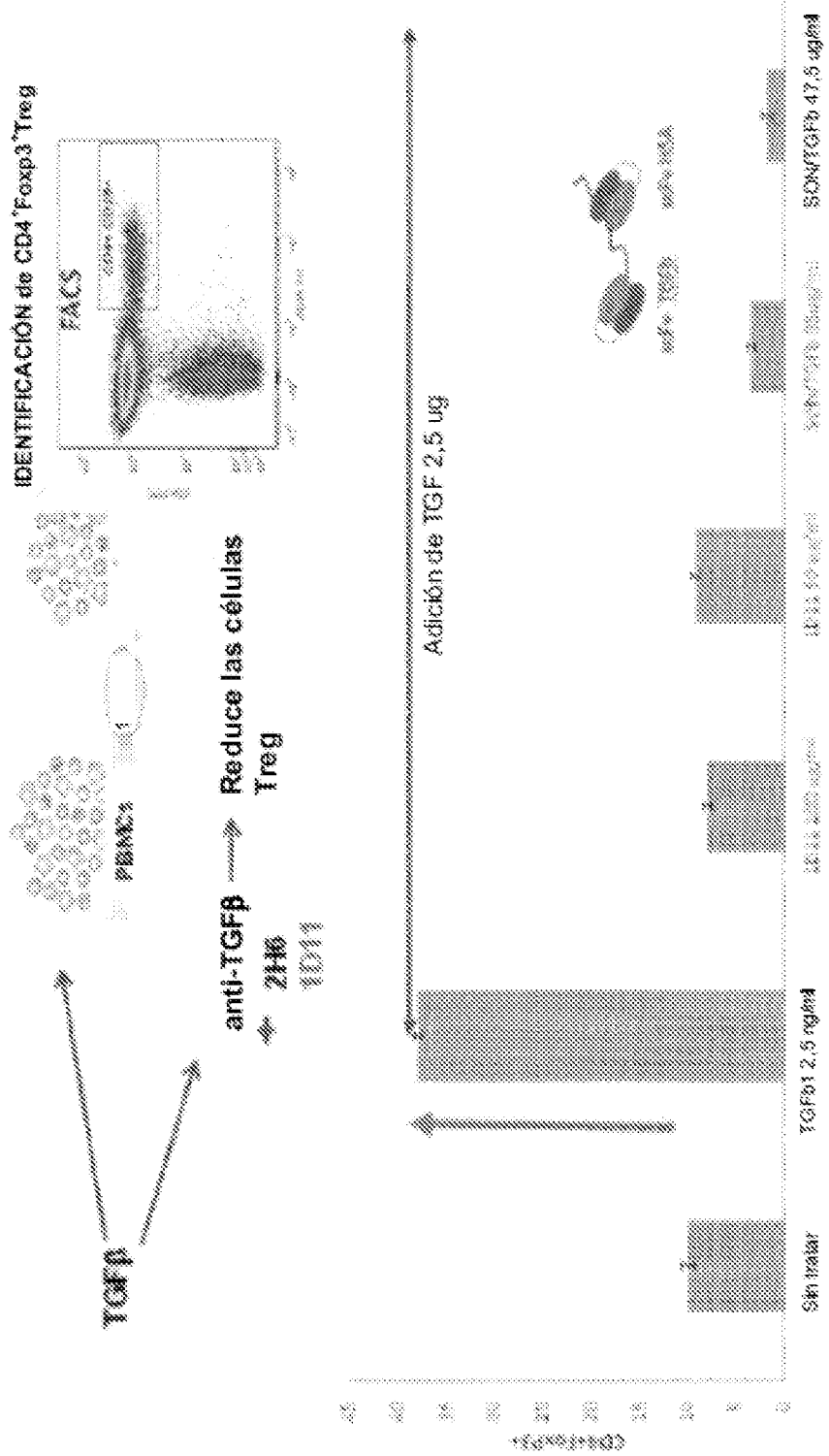


Figura 42

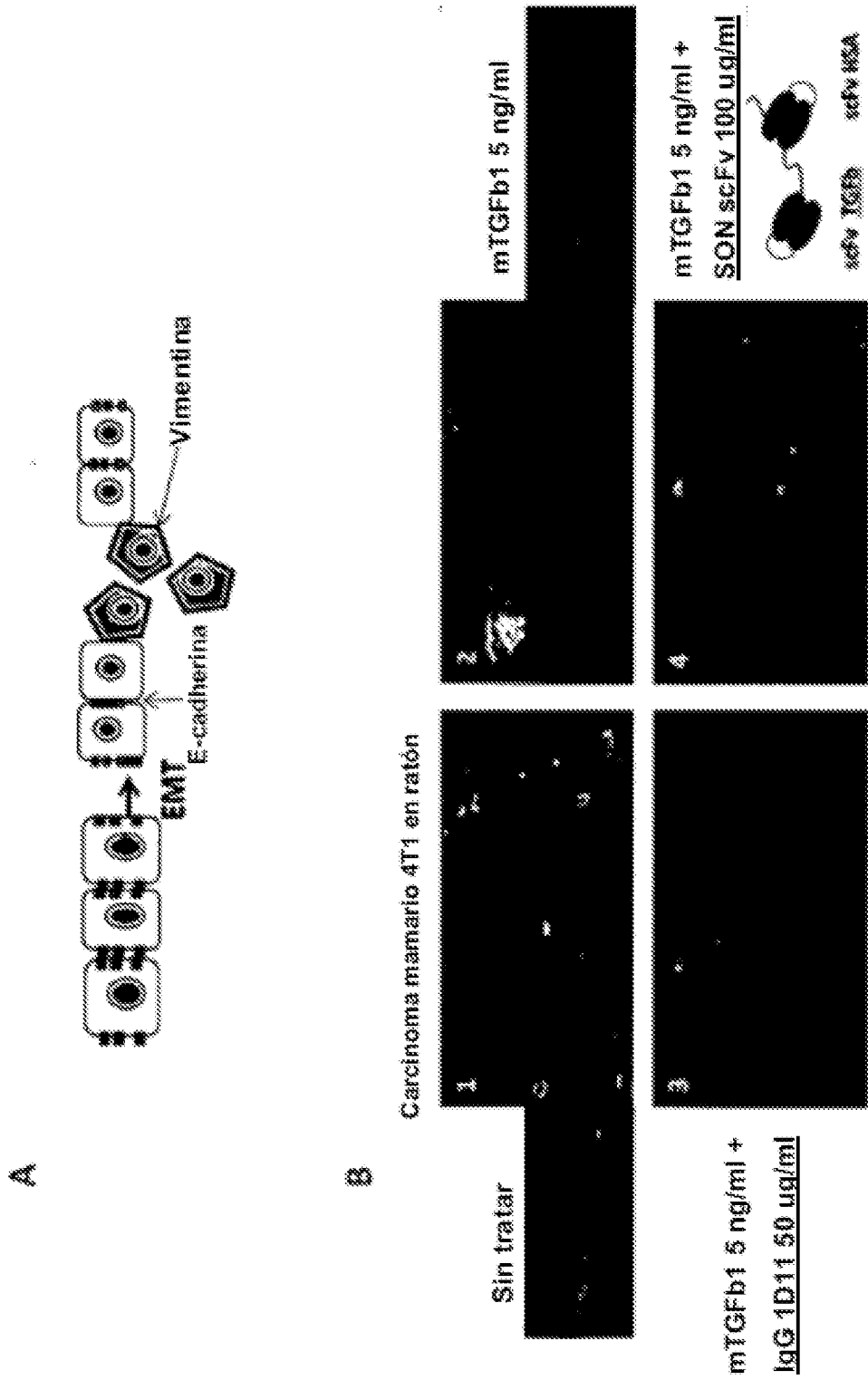


Figura 43

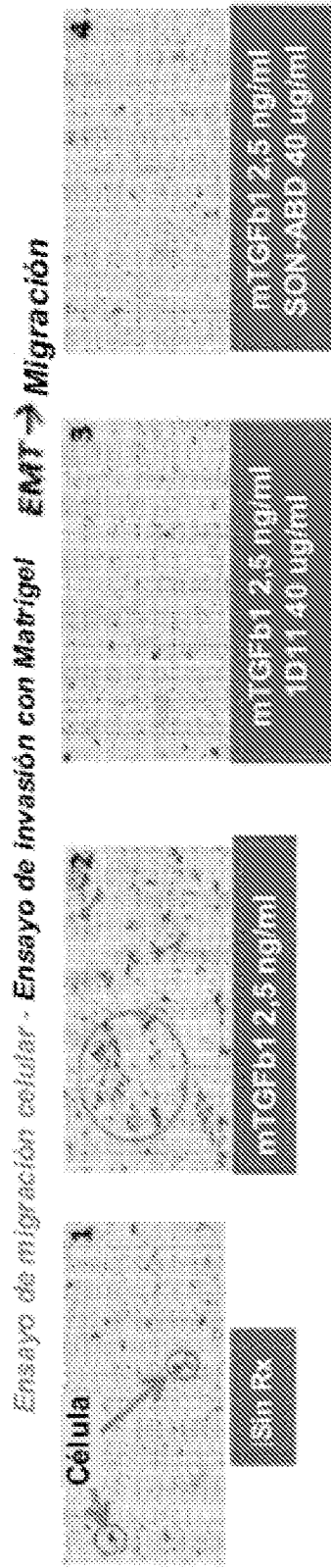


Figura 44

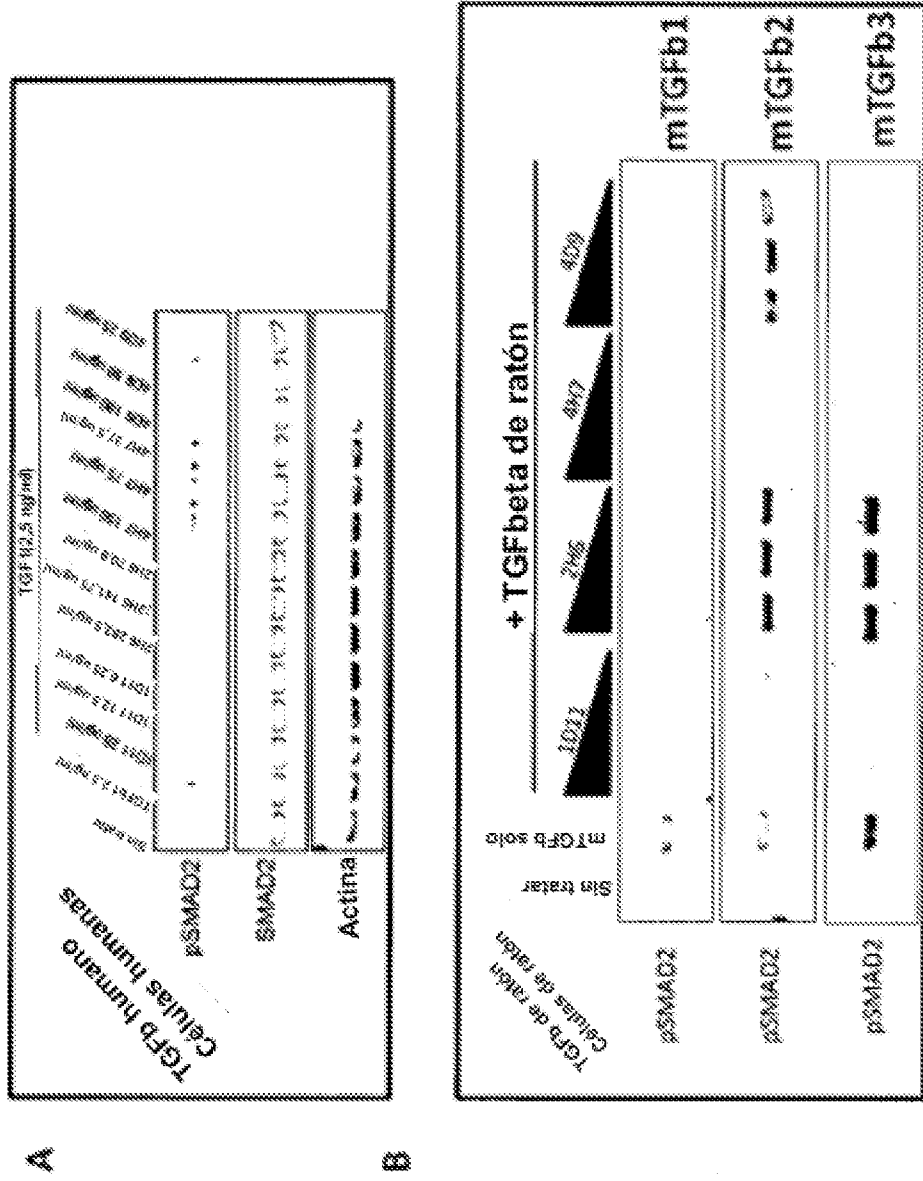


Figura 45B

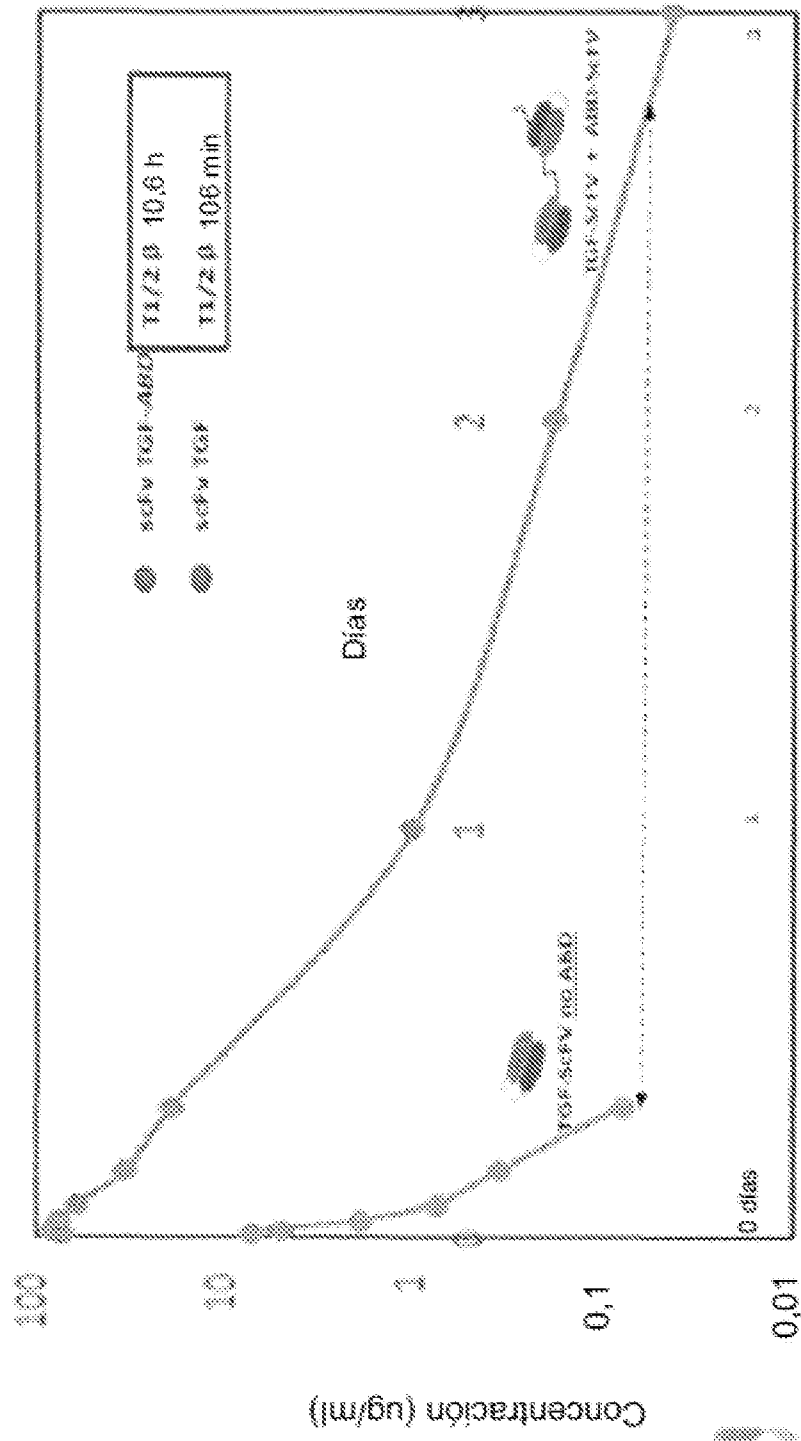


Figura 46

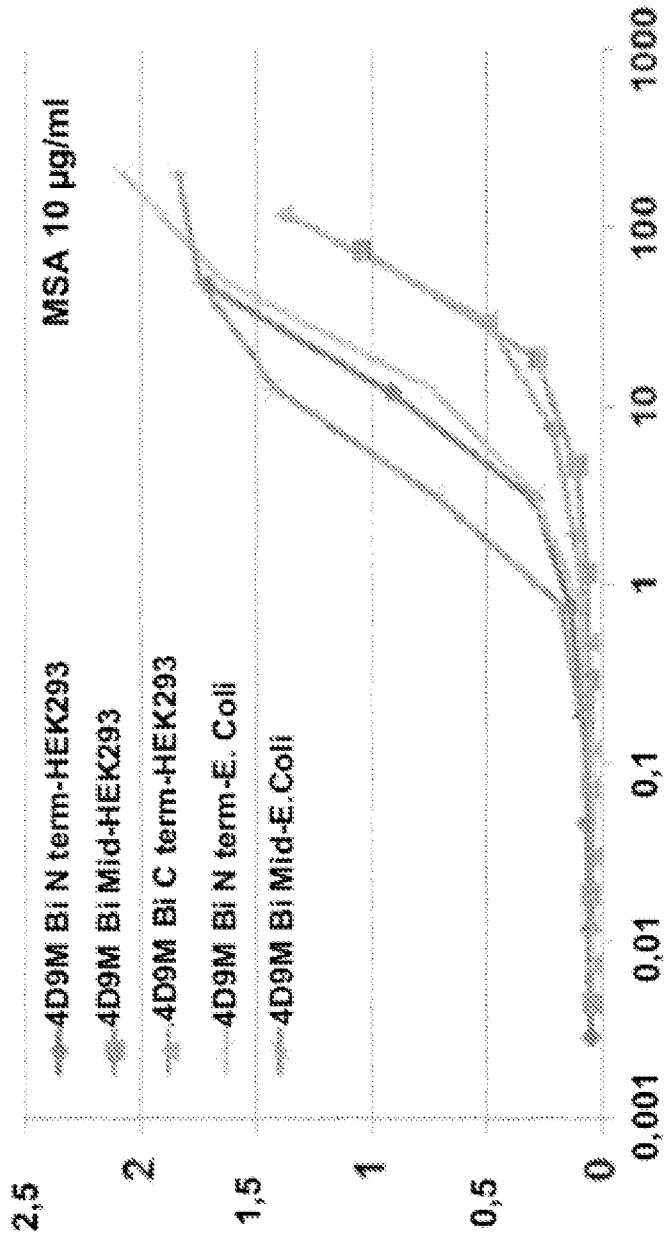


Figura 47

Valores de EC50 ensayo de proliferación de células T de ratón con m/h TGF 1 y 3 @ 1 ng y m/h TGF 2 @ 10 ng-
inhibición de EC50

	TGFβ1 de ratón	TGFβ2 de ratón	TGFβ3 de ratón	TGFβ1 humano	TGFβ2 humano	TGFβ3 humano
	(1 ng/ml)	(10 ng/ml)	(1 ng/ml)	(1 ng/ml)	(10 ng/ml)	(1 ng/ml)
	EC50 (ug/ml)	EC50 (ug/ml)	EC50 (ug/ml)	EC50 (ug/ml)	EC50 (ug/ml)	EC50 (ug/ml)
4D2M-AGM	1,914	2,549	1,552	2,094	2,134	2,131
4H7M-AGM	7,505	5,495	5,969	5,297	4,949	5,435

Figura 48A

Enlazadores cambiados positivamente

Nombre	Secuencia	Longitud	Carga
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGS	15	0
Enlazador	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	18	+1
6paxA_1 (+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4
+B	GKGGSGKGGSGKGGG	15	+3
+C	GGKSGGGKSGGGKGS	15	+3
+D	GGKSGGGKSGGGKS	15	+3
+E	GKGKSGKSGKSGKGS	15	+6
+F	GGKSGGGKSGKGGG	15	+3
+G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4
+I	GKGKSGKSGKSGKSGKGS	20	+8

Figura 48B

Enlazadores cambiados negativamente

Nombre	Secuencia	Longitud	Carga
Gly-Ser 15	GGGCSGGGGSGGGSGGGGS	20	0
3hac_2 (-A)	STAGDTHLGGEDFD	14	-4
-B	GEGSGEGGSGEGGS	15	-3
-C	GGGSGGGGSGGGGS	15	-3
-D	GGGSGGGGSGGGGS	15	-3
-E	GEGSGEGGSGEGGS	15	-6
-F	GGGSGGGGSGGGGS	15	-3
-G	GEGSGEGGSGEGGSGEGGS	20	-8

Enlazadores adicionales

GGGGSGGGGSGGGGS

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

PRGASKSGSASQTGSAPGS

GTAAAGAGAAGGAAAGAAG

GTSGSSGSGSGGGSGSGGGG

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

GGGGGS

Figura 49A

IL-2

hIL-2 humana

Aptssstkkkqlqlehlldlqmilnginnyknpkltmrmitfkfymppkkatekhlqcleeeekpleevinlaqsknfhlrprdlisninvivl
elkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

hIL-2 humana-A10m3

aptssstkkkqlqlehlldlqmilnginnyknpkltmrmitfkfymppkkatekhlqcleeeekpleevinlaqsknfhlrprdlisninvivl
elkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQPG
RSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRL
RAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVSVA
PGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY
YCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

mIL-2 de ratón

Aptssstssstaeaqqqqqqqqqqqhlegllmdlqellsrmenyrniklprmitfkfypkqatekdlqcledeigprrhvidltqsk
sfqledaenfisnirvtvkkikgsdntfecqfdedesatvdfirrwiafcqsiistspq

mIL2 de ratón-A10m3

aptssstssstaeaqqqqqqqqqqqhlegllmdlqellsrmenyrniklprmitfkfypkqatekdlqcledeigprrhvidltqsk
fqledaenfisnirvtvkkikgsdntfecqfdedesatvdfirrwiafcqsiistspqGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISR
DNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGG
VHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGN
TATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 49B

IL-7

hIL-7 humana

dcdiegkdgkqyesvImvsIdqildsmkeigsncInnefnffkrhicdankegmffraarkirqflkmnstgdfdlhllkvsegttilnc
tgqvkgrkpaalgeaqptksleensikeqkkIndicflkrllqeiktCwnkilmgtkeh

hIL-7 humana-A10m3

dcdiegkdgkqyesvImvsIdqildsmkeigsncInnefnffkrhicdankegmffraarkirqflkmnstgdfdlhllkvsegttilnc
tgqvkgrkpaalgeaqptksleensikeqkkIndicflkrllqeiktCwnkilmgtkehGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSACAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGG
GGSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIPERVSGSN
SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

mIL-7 de ratón

EchikdkegkayesvImisideldkmtgtdsncpnnepnffkrhvcddtkeaaflnraarkikqflkmniseefnvhlitvsqgtqtlv
nctskeeknvkeqkkndacflkrllreiktCwnkilkgsi

mIL-7 de ratón-A10m3

echikdkegkayesvImisideldkmtgtdsncpnnepnffkrhvcddtkeaaflnraarkikqflkmniseefnvhlitvsqgtqtlv
nctskeeknvkeqkkndacflkrllreiktCwnkilkgsiGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQ
PGRSLRLSACAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVS
VAPGQTATITCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDE
ADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 49C

IL-12

hIL-12 humanasc

lwekkdvyyvveidwypdapgemvvlctdtpeedgitwtidqssevlsgkttiqvkefgdagqytchkggevlshsillihkke
dgiwstdiikdqkepkntfirceaknysgrftcwwlittistdltsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqed
sacpaaeesipievmdavhkkkyenytsffirdiikpdpkniqlkpknsrqvevsweyypdtwstphsyfsitfcvqvqgkksk
rekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswwsewasvpcsGGGGGG5rnlpvatpdpgmfpcihhsqnilravsnmlq
karqtiefypctseeidheditkdktstveaclpleltnescinsretsfitngsclsrktsfmmalclssiyedikmyqvefktmnakil
mdpkrqifldqnmlavidelmqalnfnsetvpqkssleepdfytkkiklcillhafriravtidrvtsylnas

hIL-12 humanasc-A10m3

lwekkdvyyvveidwypdapgemvvlctdtpeedgitwtidqssevlsgkttiqvkefgdagqytchkggevlshsillihkke
dgiwstdiikdqkepkntfirceaknysgrftcwwlittistdltsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqed
sacpaaeesipievmdavhkkkyenytsffirdiikpdpkniqlkpknsrqvevsweyypdtwstphsyfsitfcvqvqgkksk
rekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswwsewasvpcsGGGGGG5rnlpvatpdpgmfpcihhsqnilravsnmlq
mdpkrqifldqnmlavidelmqalnfnsetvpqkssleepdfytkkiklcillhafriravtidrvtsylnasGGGGSGGGGSGGGG
SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDQAVMHWVRQAPGKLEWVAGISSNSGYIG
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVTVSSASTGGGG
SGGGSGGGGSHSSVYVLTQPPSVSVAPGQATITCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLLVYADSDRPSG
IPERVSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 49D

IL-18

hIL-18 humana-A10m3

YfgklesklsvirnIndqvlfidqgnrpifedmtdsdcrdnaprtifiismykdsqprgmavtisykcekistiscenkiisfkemnpdn
ikdtksdliiffqrvpghdnkmqfesssyegyflacekerdifkllkkedelgdrsimftvqned

hIL-18 humana-A10m3

yfgklesklsvirnIndqvlfidqgnrpifedmtdsdcrdnaprtifiismykdsqprgmavtisykcekistiscenkiisfkemnpdn
ikdtksdliiffqrvpghdnkmqfesssyegyflacekerdifkllkkedelgdrsimftvqnedGGGGSGGGSGGGSGGG
GGGGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHVVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSV
KGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVSSASTGGGGSGGG
SGGGGSSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIPERV
GSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

miL-18 de ratón-A10m3

nfgrihcttavirnIndqvlfvdkrqpvfedmtdidqsasepqrliismykdsavrglavtisykdskmstiscnkiisfeemdppen
iddiqsdliiffqrvpghnkmefesslyeghflacqkeddafkllkkdengdksvmftitnihqsGGGGSGGGSGGGSGGG
GGGGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHVVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADS
VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVSSASTGGGGSGGG
GGGGGSSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLYVYADSDRPSGIPERV
SGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 49E

IL-21

hIL-21 humana

qgqdrhmirmrqlidivdqiknyvndivpefi papedvetncewsafscfqkaqiksantgnneriinvsikkikrkppstnagrrqk
hritcpscdsyekkipkeflerfksliqkmihqhisrthgseds

lhIL-21 humana-A10m3

qgqdrhmirmrqlidivdqiknyvndivpefi papedvetncewsafscfqkaqiksantgnneriinvsikkikrkppstnagrrqk
hritcpscdsyekkipkeflerfksliqkmihqhisrthgsedsGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGG
GLIQGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAV
YYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATI
TCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW
DSRSDHLVWFVGGGTKLTVLG

miL-21 de ratón

pdrilirrhliidiveqikiyendldpellsapqdvkghcehaafacfqkaklkpsnpgnktfiidivaqirriparrggkkqkhiakcpsc
dsyekrtpkfeferikwilqkmihqhis

miL-21 de ratón-A10m3

pdrilirrhliidiveqikiyendldpellsapqdvkghcehaafacfqkaklkpsnpgnktfiidivaqirriparrggkkqkhiakcpsc
dsyekrtpkfeferikwilqkmihqhisGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQGRSLRLSCA
ASGITFDDAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAV
YYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVSSASTGGGGSGGGSGGGSGGGSVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATI
TCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW
DSRSDHLVWFVGGGTKLTVLG

Figura 49F

IL-27

hIL-27 humanasc

Rkqppaaltiprvqcrasrypiavdcswtppapnstspvsiatyrligmaarghswpciqqtptstscitidvqlfsmapyvlnvtavh
pwgsssfvypfitehiikpdpppegvrisplaerqlqvqweppgswpfpfeifskywirykrqgaarfhrvgpieatsfiiravrpraryyv
qvaaqdltdygelsdwsipatatmsigk

hIL-27 humanasc-A10m3

rkgppaaltiprvqcrasrypiavdcswtppapnstspvsiatyrligmaarghswpciqqtptstscitidvqlfsmapyvlnvtavh
pwgsssfvypfitehiikpdpppegvrisplaerqlqvqweppgswpfpfeifskywirykrqgaarfhrvgpieatsfiiravrpraryyv
qvaaqdltdygelsdwsipatatmsigkGGGGSGGGSGGGSGG5fprppgrpqislqelrreftvsihlarkilsevrgqahrfaes
hipgvnlylplgeqipdvsitfqawrrlsdpericfisttlqpfhaplggigtqgrwtmermqhwamrldirdlqrhirqvlaagfnlp
eeeeeeeeeeeeerkgilpgaigsaigqpaqvswpqlstyrilhslelvisravrelliskaghswpfpfpfeifskywirykrqgaarfhrvgpieatsfiiravrpraryyv
GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVVRQAPGKGLEWVAGIS
SNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVYSSA
STGGGGSGGGSGGGSGVHSSVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLLVYVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

miL-27 de ratónsc

Ytetalvalsqprvqchasrypvavdcswtppapnstststsiatyrligvatqqqsqpciqrsppqasrctipdvhlfstvpymlnvtavh
hpggassllafvaeriikpdpppegvrisrtagqrlqvihppaswfpdifsikyriryrrrgashfrqvgpieattftirnskphakyciqv
saqdltdygpksdwsipgqvesaphkp

miL-27 de ratónsc-A10m3

ytetalvalsqprvqchasrypvavdcswtppapnstststsiatyrligvatqqqsqpciqrsppqasrctipdvhlfstvpymlnvtavh
pggassllafvaeriikpdpppegvrisrtagqrlqvihppaswfpdifsikyriryrrrgashfrqvgpieattftirnskphakyciqv
saqdltdygpksdwsipgqvesaphkpGGGGSGGGSGGGSGG5fptdplslqelrreftvslylarkilsevrgqyvhfaesrlpgv
nidlipigyhipnvsitfqawwhisdsericfiattirpfpamlggigtqgtwtssereqhwamrldirdlhrhirqvlaagfkcskeedk
eeeeeeeeekklplgalggpnqvssqvswpqllytyqllhslelvisravrdlllslprppgsawdsGGGGSGGGSGGGSGG
GGGGSGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCAASGITFDDAVMHWVVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVYSSASTGGGGSG
GGGGSGGGSGVHSSVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPVLLVYVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 49G

GM-CSF-ABD

GM-CSF humano

MWLQSLLLLGTVACSIAPARSPPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCL
QTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFE5FKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEQE

GM-CSF humano-A10m3

MWLQSLLLLGTVACSIAPARSPPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCL
QTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFE5FKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEQEGG
GGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLS CAASGITFD DAVMHWVRQAPGKGLE
WVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYCVKGLYSNPRGGAFDIWGQGT
MTVSSASTGGGGSGGGGGSGGGG SVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCGGNNIGTKSVHWYQKPGQAPV
LVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRSDHLWVFGGGTKLTVLG

IFN- α 1

IFN- α humano

CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAVISVLHELIQQIFNLFTTKDS
SAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAVKKYFRITLYLTEKKYSPCAWEVVR
AEIMRSLSLSTNLQERLRKE

IFN- α humano-A10m3

CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAVISVLHELIQQIFNLFTTKDS
SAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAVKKYFRITLYLTEKKYSPCAWEVVR
AEIMRSLSLSTNLQERLRKEGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLIQPGRSLRLS CAAS
GITFD DAVMHWVRQAPGKGLEWVAGISSNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYYC
VKGLYSNPRGGAFDIWGQGTMTVSSASTGGGGSGGGGGSGGGG SVHSSYVLTQPPSVSVAPGQTATITCG
GNNIGTKSVHWYQKPGQAPVLVVYADSDRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRS
DHLWVFGGGTKLTVLG

Figura 50

Anti-PD-L1 10D12

Dominio pesado variable

VQLVESGGGLVXPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASRSSMAQHWWGQGLVTVSSAST

vHCDR1: GFTFSDYY

vHCDR2: ISSSGSTI

vHCDR3: ASRSSMAQH

Dominio ligero variable

SNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNS
ASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNQVFGGGTKVTVLG

vLCDR1: SGSIASY

vLCDR2: EDN

vLCDR3: QSYDSNNQV

scFv

QVQLVESGGGLVXPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASRSSMAQHWWGQGLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGNSFMLTQP
HSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK
TEDEADYYCQSYDSNNQVFGGGTKVTVLG

