(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 834 525**

(51) Int. CI.:

C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2016 PCT/EP2016/060128**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16180715**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2016 E 16723969 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3294765**

(54) Título: **Inmunoconjugados de IL2 y TNF**

(30) Prioridad:

08.05.2015 GB 201507908

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2021

(73) Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
La Lizza 7
53100 Siena, IT

(72) Inventor/es:

DE LUCA, ROBERTO;
PRETTO, FRANCESCA y
WULHFARD, SARAH

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Inmunoconjugados de IL2 y TNF

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a conjugados que comprenden interleucina 2 (IL2) y un factor de necrosis tumoral, tal como factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), y una molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo se une preferiblemente a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como el dominio extra A (ED-A) de fibronectina. El conjugado puede usarse en el tratamiento de cáncer.

Antecedentes de la invención

Muchas citocinas han mostrado potentes actividades antitumorales en experimentos preclínicos y representan agentes prometedores para la terapia contra el cáncer. Sin embargo, a pesar de los resultados alentadores en modelos animales, sólo unas pocas citocinas, tales como Proleucina 1 (IL2), Roferon A1 (interferón alfa-2a [IFNα 2a]), Intron A1 (IFNα 2b), Beromun 1 (TNFα recombinante), están aprobadas como fármacos anticancerígenos. Las indicaciones actuales para citocinas incluyen cáncer metastásico de células renales, melanoma maligno, leucemia de células pilosas, linfoma mieloide crónico, sarcoma y mieloma múltiple. Las citocinas pueden administrarse o bien solas o bien en combinación con quimioterapia.

Una dificultad adicional con las citocinas proinflamatorias en particular es que su uso en terapia a menudo se ve obstaculizado por una toxicidad sustancial incluso a dosis bajas, lo que evita el aumento hasta dosis terapéuticamente activas (Hemmerle *et al.* (2013) Br. J. Cancer 109, 1206-1213).

En un intento de aumentar el índice terapéutico de determinadas citocinas, se han propuesto proteínas de fusión anticuerpo-citocina (también denominadas “inmunocitocinas”). En estos conjugados, el anticuerpo sirve como “vehículo” para una acumulación selectiva en el sitio de enfermedad, mientras que la carga útil de la citocina es responsable de la actividad terapéutica (Pasche y Neri, 2012, Drug Discov. Today, 17, 583). Determinadas inmunocitocinas basadas en cargas útiles proinflamatorias (tales como IL2, IL4, IL12 y TNFα) presentan una potente actividad anticancerígena en modelos de ratón (Hess *et al.*, 2014, Med. Chem. Comm., 5, 408) y han producido resultados alentadores en pacientes tanto con tumores sólidos como con neoplasias hemáticas (Eigentler *et al.*, 2011, Clin. Cancer Res. 17, 7732-7742; Papadia *et al.*, 2013, J. Surg. Oncol. 107, 173-179; Gutbrodt *et al.*, 2013, Sci. Transl. Med. 5, 201-204; Weide *et al.*, 2014, Cancer Immunol. Res. 2, 668-678; Danielli *et al.*, 2015, Cancer Immunol. Immunother. 64, 113-121]. El anticuerpo F8 (específico para el dominio ED-A sometido a corte y empalme alternativo de fibronectina, un marcador de angiogénesis tumoral; Rybak *et al.* (2007) Cancer Res. 67, 10948-10957) se ha usado para seleccionar tumores como diana, tanto solo como fusionado con o bien TNF o bien IL2 (Villa *et al.* (2008) Int. J. Cancer 122, 2405-2413; Hemmerle *et al.* (2013) Br. J. Cancer 109, 1206-1213; Frey *et al.* (2008) J. Urol. 184, 2540-2548).

En algunos casos, las inmunocitocinas pueden mediar la eliminación del tumor en modelos de ratón de cáncer cuando se usan como únicos agentes (Gutbrodt *et al.*, 2013, Sci. Transl. Med. 5, 201-204). Sin embargo, en la mayoría de los casos, un único producto de inmunocitocina no puede inducir una completa eliminación del cáncer. Sin embargo, se han notificado curas para el cáncer para combinaciones de inmunocitocinas con agentes citotóxicos (Moschetta *et al.*, 2012, Cancer Res. 72, 1814-1824], anticuerpos intactos (Schliemann *et al.*, 2009, Blood, 113, 2275-2283] y radiación de haz externo (Zegers *et al.*, 2015, Clin. Cancer Res., 21, 1151-1160).

Además, se han usado varias combinaciones de inmunocitocinas en terapia. Por ejemplo, los conjugados L19-IL2 y L19-TNFα pudieron curar el neuroblastoma en un modelo de ratón completamente singénico de la enfermedad, mientras que las inmunocitocinas individuales usadas como únicos agentes no dieron como resultado la eliminación de la enfermedad (Balza *et al.*, 2010, Int. J. Cancer, 127, 101). La combinación de cargas útiles de IL2 y TNFα también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos. Se demostró que las proteínas de fusión L19-IL2 y L19-TNF presentan una potente sinergia para el tratamiento intralesional de determinados tumores sólidos en el ratón (Schwager *et al.*, 2013, J. Invest. Dermatol. 133, 751-758). Las proteínas de fusión completamente humanas correspondientes se han administrado por vía intralesional a pacientes con melanoma en estadio IIIC (Danielli *et al.*, 2015, Cancer Immunol. Immunother. 64, 113-121), mostrando mejores resultados en comparación con la administración intralesional de interleucina-2 (Weide *et al.*, 2011, Cancer - 116, 4139-4146) o de L19-IL2 (Weide *et al.*, 2014, Cancer Immunol. Immunother. 2, 668-678). Sin embargo, la fusión genética de una citocina con un anticuerpo no siempre da como resultado una eficacia aumentada. Por ejemplo, la fusión de interleucina-17 con un anticuerpo de direccionamiento no redujo el crecimiento tumoral (Pasche *et al.*, 2012, Angiogenesis 15, 165-169).

También se han intentado generar “inmunocitocinas dobles” en las que un anticuerpo se fusiona genéticamente con dos citocinas diferentes. Por ejemplo, se han incorporado interleucina-12 (IL12) y TNFα en una única entidad molecular. Sin embargo, estos intentos no han resultado exitosos y no han conducido a programas de desarrollo clínico.

Específicamente, se ha descrito una fusión triple que consiste en: (i) el anticuerpo L19 en formato scFv (específico para el dominio ED-B sometido a corte y empalme alternativo de fibronectina, un marcador de angiogénesis tumoral); (ii) TNFα murino; y (iii) IL12 murina en formato de cadena sencilla (Halin *et al*., 2003, Cancer Res., 63, 3202-3210). La proteína de fusión pudo expresarse y purificarse hasta homogeneidad. La proteína de fusión también se unió al antígeno relacionado con afinidad y especificidad altas, pero (a diferencia de L19-TNFα y L19-IL12) no pudo localizar tumores sólidos *in vivo,* tal como demuestran estudios de biodistribución cuantitativos en ratones que portan tumores.

También se han descrito proteínas de fusión de citocinas bifuncionales en las que las citocinas se unieron a un anticuerpo intacto (o la porción Fc de un anticuerpo). Estas proteínas de fusión comprendían interleucina-2/interleucina-12 (IL-2/IL-12) o interleucina-4/factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (IL-4/GM-CSF). La actividad de las citocinas se conservó en constructos en los que las citocinas se fusionaron en tándem en el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada (H) del Fc o del anticuerpo, así como en constructos en los que una citocina se fusionó en el extremo carboxilo-terminal de la cadena H mientras que la segunda citocina se fusionó al extremo amino-terminal de la región variable de cadena o bien H o bien ligera (L). Se conservó la unión al antígeno de las proteínas de fusión anticuerpo-citocina. Sin embargo, sólo se notificaron las actividades terapéuticas *in vivo* para aplicaciones de terapia génica (es decir, células tumorales transfectadas con las inmunocitocinas IL2/IL12 apropiadas), pero no con proteínas terapéuticas (Gillies *et al*., 2002, Cancer Immunol. Immunother., 51, 449).

Como resultado de la complejidad intrínseca de expresar con éxito inmunoconjugados que comprenden dos citocinas en una sola molécula (también denominados “inmunocitocinas dobles”), así como los resultados poco prometedores obtenidos con tales moléculas tal como se comentó anteriormente, no se ha continuado con estos formatos moleculares para aplicaciones clínicas.

Pretto *et al*., 2013, Cancer Immunol. Immunother., 63, 901-910 notifican una inmunocitocina basada en el anticuerpo F8 fusionado con IL-2 humana.

Descripción de la invención

Los presentes inventores han preparado un conjugado que comprende el anticuerpo F8, que es específico para el dominio extra A (ED-A) de fibronectina, en formato scFv, IL2 y TNFα. Este conjugado no sólo tiene ventajas en cuanto a la fabricación y administración con respecto al uso de dos conjugados por separado, que comprenden IL2 y TNFα, respectivamente, sino que sorprendentemente muestra una selección de tumores como diana mejorada *in vivo* en comparación con conjugados que comprenden el mismo anticuerpo y o bien IL2 o bien TNFα. Esto resultó particularmente inesperado dada la ausencia de selección de tumores como diana observada con una inmunocitocina que comprende TNFα e IL12 tal como se da a conocer en Halin *et al.* (2003) y la ausencia de actividad terapéutica notificada para inmunocitocinas que comprenden IL-2 e IL-12 o IL-4 y GM-CSF en Gillies *et al.* (2002).

Además, los presentes inventores encontraron que, cuando se administra a ratones que portan tumores, el nuevo conjugado conserva la actividad terapéutica *in vivo* observada en ratones con la administración combinada de (i) el anticuerpo F8 conjugado con TNFα y (ii) el anticuerpo F8 conjugado con IL2, a la vez que presenta, sorprendentemente, un perfil de toxicidad considerablemente más leve.

La invención proporciona una proteína de fusión que comprende interleucina-2 (IL2), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y un Fv de cadena sencilla (scFv) que se une al dominio extra A (ED-A) de fibronectina, según las reivindicaciones.

Por tanto, en el presente documento se da a conocer un conjugado que comprende interleucina-2 (IL2), un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos. En el presente documento también se da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica para un conjugado de este tipo, así como un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de este tipo. También se contempla una célula huésped que comprende un vector de este tipo.

En el presente documento también se da a conocer un conjugado para su uso en un método de tratamiento de cáncer dirigiendo IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, a la neovasculatura *in vivo,* así como un conjugado para su uso en un método de administración de IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, a la neovasculatura tumoral en un paciente.

Además, en el presente documento se da a conocer un método de tratamiento de cáncer dirigiendo IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, a la neovasculatura en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de la divulgación al paciente, así como un método de administración de IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, a la neovasculatura tumoral

en un paciente que comprende administrar al paciente un conjugado según la presente divulgación.

Además, en el presente documento se da a conocer el uso de un conjugado de la divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. De manera similar, se contempla el uso de un conjugado de la divulgación para la preparación de un medicamento para la administración de IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, a la neovasculatura de un tumor.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de cromatografía de exclusión molecular (SEC) del conjugado muIL2-F8-muTNFα purificado. El pico con el volumen de retención de 11,5 ml corresponde a una fracción trimérica del conjugado. El pico a un volumen de retención de 9,9 ml representa una especie multimérica no covalente del conjugado.

La figura 2 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE del conjugado muIL2-F8-muTNFα. La banda a 62 kDa corresponde al peso molecular esperado del conjugado muIL2-F8-muTNFα.

La figura 3 muestra los resultados de un ELISA realizado sobre el conjugado muIL2-F8-muTNFα. Se recubrió en los pocillos un polipéptido que contenía ED-A y se detectó mediante el conjugado muIL2-F8-muTNFα, seguido por la detección de los constituyentes del conjugado usando anticuerpos de detección. Pudieron detectarse los tres constituyentes del conjugado, es decir, IL2, TNFα y el scFv F8 en las diferentes diluciones sometidas a prueba y, por tanto, estaban presentes en el conjugado. El eje de ordenadas muestra la DO_{450}.

La figura 4 muestra los resultados de un análisis de BIAcore para determinar la unión del conjugado muIL2-F8-muTNFα al dominio extra A (ED-A) de fibronectina. Los resultados demuestran que el conjugado conserva su capacidad de unión a EDA, el antígeno relacionado del anticuerpo scFv F8.

La figura 5 muestra los resultados de un análisis de biodistribución del conjugado muIL2-F8-muTNFα. El conjugado muIL2-F8-muTNFα se acumuló selectivamente en tumores en un modelo de teratocarcinoma de ratón F9.

La figura 6 muestra los resultados de un experimento que compara la eficacia terapéutica del conjugado muIL2-F8-muTNFα con la administración combinada de F8-muIL2 y F8-muTNFα. Se usó PBS como control negativo. El conjugado muIL2-F8-muTNFα conservó la eficacia terapéutica observada con la administración combinada de los agentes solos (figura 6A), a la vez que tiene una toxicidad considerablemente inferior (figura 6B).

La figura 7 muestra la actividad de destrucción celular de tres conjugados que comprenden TNFα, IL2 y el anticuerpo anti-ED-A F8, con diferentes formatos. Los formatos de conjugado sometidos a prueba fueron mIL2-F8-mTNFα (figura 7A), mTNFα-F8-mIL2 (figura 7B) y F8-mIL2-mTNFα (figura 7C). Se comparó la actividad de destrucción celular de cada conjugado con la actividad de destrucción celular observada en presencia de conjugado F8-mTNFα tal como se indica debajo de cada figura. La figura 7 demuestra que la actividad de destrucción celular de los diferentes formatos de conjugado fue comparable, ya que no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las actividades observadas para los diferentes formatos de conjugado sometidos a prueba.

Los aspectos y las realizaciones adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica dada la presente divulgación que incluye los siguientes ejemplos experimentales.

Cuando se usa “y/o” en el presente documento, debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo “A y/o B” debe interpretarse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera de manera individual en el presente documento.

A menos que el contexto dicte lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención, y se aplican igual a todos los aspectos y las realizaciones que se describen.

Ahora se ilustrarán determinados aspectos y realizaciones de la invención a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

Descripción detallada

Molécula de anticuerpo

Describe una inmunoglobulina ya sea o bien natural o bien producida de manera parcial o completamente sintética. El término también se refiere a cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. En este caso, debe entenderse que las moléculas de anticuerpo pueden haberse aislado u obtenido mediante purificación a partir de fuentes naturales, o bien obtenido mediante recombinación genética o mediante

síntesis química, y que pueden contener aminoácidos no naturales.

Dado que los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, debe interpretarse que el término “molécula de anticuerpo” cubre cualquier sustancia o miembro de unión específico que tiene un sitio de unión a antígeno de anticuerpo con la especificidad y/o unión a antígeno requeridas. Por tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpo, en particular fragmentos de unión a antígeno, y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, ya sea o bien natural o bien parcial o completamente sintético. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, o equivalente, fusionadas con otro polipéptido (por ejemplo, perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y una gran cantidad de bibliografía posterior.

Tal como se mencionó anteriormente, los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) Nature 341, 544-546; McCafferty *et al.*, (1990) Nature, 348, 552-554; Holt *et al.* (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490), que consiste en un dominio VH o VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un ligador peptídico que permite la asociación de los dos dominios para formar un sitio de unión a antígeno (Bird *et al.* (1988) Science, 242, 423-426; Huston *et al.* (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento WO93/1161) y (ix) “diacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; Holliger *et al.* (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes de disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter *et al.* (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245). También pueden elaborarse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu *et al.* (1996), Cancer Res., 56(13):3055-61). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab’, que difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos residuos en el extremo carboxilo-terminal del dominio de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab’-SH, que es un fragmento Fab’ en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre.

La semivida de las moléculas de anticuerpo para su uso en la presente divulgación, o de los conjugados de la divulgación, puede aumentarse mediante una modificación química, especialmente mediante pegilación, o mediante la incorporación en un liposoma.

Una molécula de anticuerpo para su uso en la presente divulgación es, o comprende, preferiblemente un scFv. Un anticuerpo que comprende un scFv incluye un diacuerpo. Lo más preferiblemente, la molécula de anticuerpo para su uso en la presente divulgación es un scFv. Los diacuerpos y scFv no comprenden ninguna región Fc de anticuerpo, reduciendo potencialmente de ese modo los efectos de reacción anti-idiotípica.

Cuando la molécula de anticuerpo es un scFv, los dominios VH y VL del anticuerpo están unidos preferiblemente mediante un ligador de 14 a 20 aminoácidos. En la técnica se conocen ligadores adecuados y disponibles para el experto. Por ejemplo, el ligador puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3.

Cuando la molécula de anticuerpo es un diacuerpo, los dominios VH y VL pueden estar unidos mediante un ligador de 5 a 12 aminoácidos. Un diacuerpo comprende dos moléculas VH-VL que se asocian para formar un dímero. Los dominios VH y VL de cada molécula VH-VL pueden estar unidos mediante un ligador de 5 a 12 aminoácidos.

Los presentes inventores han mostrado que un conjugado que comprende IL2 y TNFα y una molécula de anticuerpo que se une al dominio extra A (ED-A) de fibronectina puede dirigirse con éxito a la neovasculatura tumoral *in vivo.* Se espera que otros conjugados que comprenden IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos sean igualmente adecuados para dirigir IL2 y TNF a la neovasculatura tumoral y, por tanto, encuentren aplicación en el tratamiento de cáncer. En la técnica se conocen muchos de tales antígenos, al igual que los anticuerpos que pueden unirse a tales antígenos. Además, pueden generarse anticuerpos contra un antígeno dado usando métodos bien conocidos tales como aquellos descritos en la presente solicitud. En un ejemplo, el antígeno puede ser un componente de la matriz extracelular asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como fibronectinas, incluyendo la isoforma del dominio extra A (ED-A) de fibronectina (A-FN) o el ED-A de fibronectina. En la técnica se conocen anticuerpos que se unen al ED-A de fibronectina y, por tanto, también a A-FN, e incluyen el anticuerpo F8.

Por tanto, una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación puede unirse a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación se une a un componente de la matriz extracelular asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN, o el ED-A de fibronectina. Más preferiblemente, una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación se une a A-FN o el ED-A de fibronectina. Lo más preferiblemente, una molécula de anticuerpo para

su uso en la divulgación se une al ED-A de fibronectina.

Los presentes inventores también han mostrado que un conjugado que comprende IL2 y TNFα y una molécula de anticuerpo que se une al dominio extra A (ED-A) de fibronectina muestra una toxicidad reducida en comparación con la administración combinada de (i) el anticuerpo anti-ED-A conjugado con TNFα y (ii) el anticuerpo anti-ED-A conjugado con IL2. Se espera que otros conjugados que comprenden IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos tengan igualmente una toxicidad reducida. Por tanto, un conjugado según la presente divulgación, que comprende IL2, TNFα y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, muestra preferiblemente una toxicidad reducida cuando se administra a un paciente, en comparación con la administración combinada de (i) un conjugado que comprende la molécula de anticuerpo y TNFα y (ii) un conjugado que comprende la molécula de anticuerpo e IL2, al paciente. La toxicidad reducida puede referirse a una reducción en uno o más síntomas adversos asociados con la administración del/de los conjugado(s) a un paciente. Tales síntomas adversos pueden incluir pérdida de peso, náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, sofoco, urticaria, exantema, toxicidad pulmonar, disnea, hipotensión, anafilaxis, enfermedad del suero, creatinina aumentada, cefalea.

En una divulgación preferida en el presente documento, una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación puede tener las CDR y/o los dominios VH y/o VL del anticuerpo F8 descrito en el presente documento. Una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación tiene preferiblemente las CDR del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11. Más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la divulgación comprende los dominios VH y/o VL del anticuerpo F8 expuestos en las SEQ ID NO: 2 y 4. Aún más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la divulgación comprende los dominios VH y VL del anticuerpo F8 expuestos en las SEQ ID NO: 2 y 4. El anticuerpo F8 está preferiblemente en formato scFv o diacuerpo, lo más preferiblemente en formato scFv. Cuando el anticuerpo F8 está en formato scFv, la molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

Un anticuerpo para su uso en la divulgación puede unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina, con la misma afinidad que el anticuerpo anti-ED-A F8, por ejemplo, en formato scFv, o con una afinidad que es mejor.

Una molécula de anticuerpo de la presente divulgación puede unirse al mismo epítopo en A-FN y/o el ED-A de fibronectina que el anticuerpo anti-ED-A F8.

Pueden producirse y usarse variantes de moléculas de anticuerpo dadas a conocer en el presente documento. Las técnicas requeridas para realizar sustituciones dentro de las secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL del anticuerpo, en particular las regiones de entramado de los dominios VH y VL, y las moléculas de anticuerpo están disponibles generalmente en la técnica. Secuencias variantes pueden realizarse con sustituciones que puede predecirse o no que tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y someterse a prueba para determinar la capacidad para unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina, y/o para determinar cualquier otra propiedad deseada.

Se contempla que pueden realizarse desde 1 hasta 5, por ejemplo, desde 1 hasta 4, incluyendo de 1 a 3, o 1, o 2, o 3 o 4, alteraciones de aminoácido (adición, deleción, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido) en una o más de las CDR y/o el dominio VH y/o VL de una molécula de anticuerpo tal como se describe en el presente documento. Por tanto, una molécula de anticuerpo que se une a FN-A puede comprender las CDR y/o el dominio VH y/o VL del anticuerpo F8 descrito en el presente documento con 5 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 alteración de aminoácido dentro de las CDR y/o el dominio VH y/o VL. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se une a FN-A puede comprender el dominio VH y/o VL del anticuerpo F8 descrito en el presente documento con 5 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 alteración de aminoácido dentro de la región de entramado del dominio VH y/o VL. Una molécula de anticuerpo que se une a FN-A o el ED-A de fibronectina, tal como se hace referencia en el presente documento, puede comprender, por tanto, el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 2 y/o el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 4 con 5 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 alteración de aminoácido dentro de la región de entramado del dominio VH y/o VL. Una molécula de anticuerpo de este tipo puede unirse a la isoforma de ED-A o el ED-A de fibronectina con la misma, o sustancialmente la misma, afinidad que una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 2 y el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 4, o puede unirse a la isoforma de ED-A o el ED-A de fibronectina con una afinidad mayor que una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 2 y el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 4.

Una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación puede comprender un dominio VH y/o VL que tiene al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con el dominio VH y/o VL, según corresponda, del anticuerpo F8, expuesto en las SEQ ID NO: 2 y 4. Una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo F8 expuesta en SEQ ID NO: 5.

Sitio de unión a antígeno

Esto describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina el sitio de unión a antígeno de anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo sólo puede unirse a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítopo. Uno o más dominios variables de anticuerpo pueden proporcionar un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo comprende preferiblemente una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

Puede proporcionarse un sitio de unión a antígeno por medio de la disposición de regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La estructura para albergar una CDR o un conjunto de CDR será generalmente una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma, en la que la CDR o el conjunto de CDR se encuentra en una ubicación correspondiente a la CDR o el conjunto de CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL que se producen de manera natural codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse mediante referencia a Kabat *et al*. (1987) (Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. US Department of Health and Human Services), y actualizaciones del mismo, disponibles ahora en internet (en immuno.bme.nwu.edu o buscando “Kabat” usando cualquier motor de búsqueda).

Por CDR o región CDR pretende indicarse las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina tal como se define por Kabat *et al*. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, US Department of Health and Human Services (Kabat *et al*., (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington, y ediciones posteriores). Un anticuerpo contiene normalmente 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR se usa en el presente documento con el fin de indicar, según el caso, una o varias de estas regiones, o incluso la totalidad de estas regiones, que contienen la mayor parte de los residuos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítopo que reconoce.

Entre las seis secuencias cortas de CDR, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad esencialmente debido a los mecanismos de disposición de los genes que dan lugar a la misma). Puede ser tan corta como 2 aminoácidos, aunque el tamaño más grande conocido es de 26. Funcionalmente, la HCDR3 desempeña un papel, en parte, en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal *et al*., (1974), PNAS, 71:4298-4302; Amit *et al*., (1986), Science, 233:747-753; Chothia *et al*., (1987), J. Mol. Biol., 196:901-917; Chothia *et al*., (1989), Nature, 342:877-883; Caton *et al*., (1990), J. Immunol., 144:1965-1968; Sharon *et al*., (1990a), PNAS, 87:4814-4817; Sharon *et al*., (1990b), J. Immunol., 144:4863-4869; Kabat *et al*., (1991b), J. Immunol., 147:1709-1719).

Un sitio de unión a antígeno que forma parte de una molécula de anticuerpo para su uso en la divulgación tiene preferiblemente las CDR del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11.

Preparación y selección de moléculas de anticuerpo

En la técnica hay disponibles diversos métodos para obtener moléculas de anticuerpo contra un antígeno diana. Las moléculas de anticuerpo para su uso en la divulgación son preferiblemente anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que pueden obtenerse según los métodos convencionales bien conocidos por el experto en la técnica. Una molécula de anticuerpo para su uso en la presente divulgación es lo más preferiblemente una molécula de anticuerpo humana.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno diana. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica para la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de una molécula de anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de entramado, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y una gran cantidad de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo también puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Las técnicas disponibles en la técnica de diseño por ingeniería de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden elaborarse hibridomas humanos tal como se describe por Kontermann y Dubel (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545. La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión específicos, se ha descrito en detalle en muchas publicaciones tales como el documento WO92/01047 (comentado en más detalle a continuación) y las patentes estadounidenses US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545. Pueden

usarse ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpo de ratón están inactivados y funcionalmente reemplazados por genes de anticuerpo humano, a la vez que mantienen intactos otros componentes del sistema inmunitario de ratón, para aislar anticuerpos humanos (Mendez *et al*., (1997), Nature Genet, 15(2): 146-156).

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a las técnicas que se describen, en particular, en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pág. 726, 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256:495-497.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra el antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tales como A-FN o el ED-A de fibronectina, según los métodos de trabajo habituales, mediante recombinación genética partiendo de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica para A-FN o un fragmento de la misma, o mediante síntesis de péptidos partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia del péptido de A-FN y/o un fragmento de la misma.

Pueden crearse moléculas de anticuerpo sintéticas mediante expresión a partir de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo, tal como se describe por Knappik *et al*. (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86 o Krebs *et al*. (2001) Journal of Immunological Methods, 254 67-84.

Alternativamente, pueden obtenerse una o más moléculas de anticuerpo para un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tales como A-FN o el ED-A, poniendo en contacto una biblioteca de moléculas de anticuerpo y el antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A o un fragmento peptídico del mismo, y seleccionando una o más moléculas de anticuerpo de la biblioteca que pueden unirse al antígeno.

Puede examinarse una biblioteca de anticuerpos usando selección iterativa de colonias en filtros (ICFS). En ICFS, se hacen crecer bacterias que contienen el ADN que codifica para varias especificidades de unión en un medio líquido y, una vez que se ha alcanzado la fase de crecimiento exponencial, algunos miles de millones de ellas se distribuyen sobre un soporte de crecimiento que consiste en un filtro de membrana tratado previamente de manera adecuada que se incuba hasta que aparecen colonias bacterianas completamente confluentes. Un segundo sustrato de atrapamiento consiste en otro filtro de membrana, humidificado previamente y cubierto con el antígeno deseado.

El filtro de membrana de atrapamiento se coloca luego sobre una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se cubre con el filtro de crecimiento con la superficie cubierta con colonias bacterianas orientada hacia arriba. Por tanto, la estructura intercalada obtenida se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Por tanto, es posible obtener la expresión de los genes que codifican para fragmentos de anticuerpo scFv que tienen una acción de proliferación, de modo que se atrapan aquellos fragmentos que se unen específicamente al antígeno que está presente en la membrana de atrapamiento. A continuación, se trata la membrana de atrapamiento para señalar fragmentos de anticuerpo scFv unidos con técnicas colorimétricas usadas comúnmente con este fin.

La posición de los puntos coloreados en el filtro de atrapamiento permite volver a las colonias bacterianas correspondientes que están presentes en la membrana de crecimiento y que produjeron fragmentos de anticuerpo atrapados. Tales colonias se recolectan y se hacen crecer, y las bacterias, algunos pocos millones de ellas, se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. A continuación se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana de atrapamiento corresponden a colonias positivas individuales, cada una de las cuales representa una potencial fuente de fragmentos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno usado en la selección. La ICFS se describe en, por ejemplo, el documento WO0246455.

También pueden presentarse una biblioteca en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables, tales como partículas de bacteriófagos (por ejemplo, T7), u otros sistemas de presentación *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular un ácido nucleico que codifica para el dominio variable VH de anticuerpo presentado en el mismo y, opcionalmente, también un dominio VL presentado si está presente. La presentación en fagos se describe en el documento WO92/01047 y, por ejemplo, las patentes estadounidenses US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

Tras la selección de moléculas de anticuerpo que pueden unirse al antígeno y presentarse en bacteriófagos u otras partículas o complejos moleculares de la biblioteca, puede tomarse un ácido nucleico a partir de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta dicha molécula de anticuerpo seleccionada. Tal ácido nucleico puede usarse en la producción posterior de una molécula de anticuerpo o un dominio variable VH o VL de anticuerpo mediante expresión a partir de un ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta dicha molécula de anticuerpo seleccionada.

La capacidad para unirse a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN o el EDA de fibronectina, puede someterse a prueba adicionalmente, por ejemplo, la capacidad para competir con un anticuerpo específico para A-FN o el ED-A de fibronectina, tal como el anticuerpo F8.

También pueden generarse novedosas regiones VH o VL que portan secuencias derivadas de las CDR para su uso en la divulgación usando mutagénesis al azar de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. En algunas divulgaciones, se realizan una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio variable completo o conjunto de CDR. Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a las regiones CDR de los genes de VH o VL.

Los dominios variables empleados en la divulgación pueden obtenerse o derivarse a partir de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse a partir de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR para su uso en la divulgación (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks *et al.* (1992) describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que se usan cebadores de consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable junto con cebadores de consenso para la tercera región de entramado de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks *et al.* describen además cómo puede combinarse este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de la CDR3 de la presente divulgación pueden permutarse al azar con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y pueden combinarse los dominios VH o VL completos permutados al azar con un dominio VL o VH relacionado para proporcionar moléculas de anticuerpo para su uso en la divulgación. A continuación, puede presentarse el repertorio en un sistema huésped adecuado, tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047, o cualquiera de una gran cantidad de bibliografía posterior, incluyendo Kay, Winter y McCafferty (1996), de modo que pueden seleccionarse moléculas de anticuerpo adecuadas. Un repertorio puede consistir en cualquiera a partir de 10^4 miembros individuales o más, por ejemplo al menos 10^5, al menos 10^6, al menos 10^7, al menos 10^8, al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros.

Un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN o el ED-A de fibronectina, puede usarse en la selección de moléculas de anticuerpo, por ejemplo, moléculas de anticuerpo, para su uso en la divulgación. La selección puede ser una selección de un repertorio tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento.

De manera similar, pueden injertarse una o más, o las tres, CDR en un repertorio de dominios VH o VL que se examinan luego para seleccionar una molécula de anticuerpo o moléculas de anticuerpo para un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN o el ED-A de fibronectina. Puede emplearse una o más de las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo F8, o el conjunto de las HCDR del anticuerpo F8, y/o puede empelarse una o más de las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo F8, o el conjunto de las LCDR del anticuerpo F8.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones de entramado de intervención. La porción también puede incluir al menos aproximadamente el 50 % de cualquiera o ambas de las regiones de entramado primera y cuarta, siendo el 50 % el 50 % C-terminal de la primera región de entramado y el 50 N-terminal % de la cuarta región de entramado. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos no asociados normalmente con regiones de dominio variable que se producen de manera natural. Por ejemplo, la construcción de moléculas de anticuerpo de la divulgación elaboradas mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N o C-terminales codificados por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de ligadores para unir los dominios variables dados a conocer en otra parte en el presente documento a secuencias de proteínas adicionales que incluyen regiones constantes de anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o etiquetas detectables/funcionales tal como se comenta en más detalle en otra parte en el presente documento.

Aunque las moléculas de anticuerpo pueden comprender un par de dominios VH y VL, en la divulgación también pueden usarse dominios de unión individuales basados en cualquiera de las secuencias de los dominios VH o VL. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios VH, pueden unirse a antígenos diana de una manera específica. Por ejemplo, véase la discusión de dAb anterior.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios pueden usarse para seleccionar dominios complementarios que pueden formar una molécula de anticuerpo de dos dominios que puede unirse a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN o el ED-A de fibronectina. Esto puede lograrse mediante métodos de selección por presentación en fagos usando el denominado enfoque combinatorio dual jerárquico tal como se da a conocer en el documento WO92/01047, en el que se usa una colonia

individual que contiene un clon de la cadena o bien H o bien L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican para la otra cadena (L o H), y se selecciona la molécula de anticuerpo de dos cadenas resultante según técnicas de presentación en fagos tales como aquellas descritas en esa referencia. Esta técnica también se da a conocer en Marks 1992.

Los fragmentos de anticuerpos completos para su uso en la divulgación pueden obtenerse partiendo de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden dominios VH y/o VL o las CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, mediante métodos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante escisión de los puentes disulfuro por reducción química. De otra manera, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo mediante técnicas de recombinación genética del mismo modo bien conocidas por el experto en la técnica o bien mediante síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos tales como aquellos suministrados por la empresa Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

Conjugado

Un conjugado según la presente divulgación comprende IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como se describe en el presente documento. La molécula de anticuerpo es preferiblemente un scFv o un diacuerpo, lo más preferiblemente un scFv, tal como se describe en el presente documento.

La IL2 y el factor de necrosis tumoral son preferiblemente IL2 humana y TNF humano. Cuando el factor de necrosis tumoral es TNFα, el TNFα es preferiblemente TNFα humano.

La IL2 comprende o consiste preferiblemente en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12. Normalmente, la IL2 tiene al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12. La IL2 en conjugados de la divulgación conserva la actividad biológica de IL2 humana, por ejemplo, la capacidad de inhibir la proliferación celular.

El TNFα humano consiste en un dominio citoplásmico de 35 aminoácidos, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 177 aminoácidos. El dominio extracelular de 177 aminoácidos se escinde para producir una forma soluble de 157 aminoácidos, que es biológicamente activa, y que forma un trímero unido no covalentemente en disolución. En el contexto de la presente divulgación, el TNFα humano es preferiblemente la forma soluble del dominio extracelular de TNFα humano, o el dominio extracelular de TNFα humano. La secuencia de la forma soluble del dominio extracelular de TNFα humano se muestra en SEQ ID NO: 15. Por tanto, el TNFα comprende o consiste preferiblemente en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15. Normalmente, el TNFα tiene al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15. La secuencia del dominio extracelular de TNFα humano se muestra en SEQ ID NO: 40. Por tanto, alternativamente, el TNFα puede comprender o consistir en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 40. En este caso, el TNFα puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40. El TNFα en los conjugados de la divulgación conserva la actividad biológica de TNFα humano, por ejemplo, la capacidad de inhibir la proliferación celular. Lo más preferiblemente, la IL2 tiene, o comprende, la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 y/o el TNFα tiene, o comprende, la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo está conectada a la IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, a través de ligadores, por ejemplo, un ligador peptídico. De manera similar, la IL2 y el factor de necrosis tumoral pueden estar conectados a través de ligadores, por ejemplo, un ligador peptídico. Alternativamente, la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o un factor de necrosis tumoral pueden estar conectados directamente, por ejemplo, a través de un enlace químico. Cuando la molécula de anticuerpo está unida a la IL2 y un factor de necrosis tumoral por medio de uno o más ligadores peptídicos, o la IL2 y el factor de necrosis tumoral están unidos el uno al otro y a la molécula de anticuerpo por medio de uno o más ligadores peptídicos, el conjugado puede ser una proteína de fusión. Por “proteína de fusión” quiere decirse un polipéptido que es un producto de traducción resultante de la fusión de dos o más genes o secuencias codificantes de ácido nucleico en un marco de lectura abierto (ORF).

El enlace químico puede ser, por ejemplo, un enlace covalente o iónico. Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen enlaces peptídicos (enlaces amida) y enlaces disulfuro. La molécula de anticuerpo y la IL2 y/o un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, pueden estar unidos covalentemente, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos (enlaces amida). Por tanto, la molécula de anticuerpo, en particular una porción scFv de una molécula de anticuerpo, y la IL2 y/o un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, pueden producirse como una proteína de fusión.

Cuando la molécula de anticuerpo es una molécula de dos cadenas o de múltiples cadenas (por ejemplo, un diacuerpo), la IL2 y/o un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, pueden conjugarse como una proteína de fusión con una o más cadenas polipeptídicas en la molécula de anticuerpo.

El ligador peptídico que conecta la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, puede ser un ligador peptídico flexible. De manera similar, el ligador que conecta la IL2 y un factor de necrosis tumoral en algunos de los conjugados de la divulgación puede ser un ligador peptídico flexible. En la técnica se conocen ejemplos adecuados de secuencias de ligador peptídico. El ligador puede ser de 10-20 aminoácidos, preferiblemente de 10-15 aminoácidos de longitud. Lo más preferiblemente, el ligador es de 11-15 aminoácidos de longitud. El ligador puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14. Preferiblemente, la IL2 y un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, están unidos a la molécula de anticuerpo mediante los ligadores expuestos en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente. En una divulgación preferida alternativa, la IL2 está unida al dominio VL del anticuerpo mediante el ligador expuesto en SEQ ID NO: 14 y el factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, está unido a la IL2 mediante el ligador expuesto en SEQ ID NO: 13.

En el conjugado empleado en los ejemplos 1 a 6, se conjugó la IL2 con el dominio VH del scFv de F8 y se conjugó el TNFα con el dominio VL del scFv de F8, cada uno mediante un ligador peptídico tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. Sin embargo, se espera que el conjugado mostraría las mismas o similares propiedades de selección de tumores como diana y/o eficacia terapéutica si el factor de necrosis tumoral y la IL2 se conjugaran con la molécula de anticuerpo en un formato diferente. Por ejemplo, se espera que el conjugado mostrara las mismas o similares propiedades de selección de tumores como diana y/o eficacia terapéutica si el factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, se conjugara con el dominio VH y la IL2 se conjugara con el dominio VL de la molécula de anticuerpo, tal como un scFv o diacuerpo, preferiblemente mediante ligadores peptídicos. Esto se demuestra en el ejemplo 7, que muestra que la actividad de destrucción celular de un conjugado de este tipo no es diferente de manera estadísticamente significativa de la de un conjugado en el que la IL2 se conjugó con el dominio VH del scFv de F8 y el TNFα se conjugó con el dominio VL del scFv de F8. Por tanto, cuando la molécula de anticuerpo es, o comprende, un scFv, la IL2 puede estar unida al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y el TNFα puede estar unido al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico. Alternativamente, cuando la molécula de anticuerpo es, o comprende, un scFv, el TNFα puede estar unido al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y la IL2 puede estar unida al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico. El ejemplo 7 demuestra además que la actividad de destrucción celular de un conjugado en el que tanto IL2 como TNFα se conjugaron con el dominio VL del scFv de F8 no es diferente de manera estadísticamente significativa de la de un conjugado en el que la IL2 se conjugó con el dominio VH del scFv de F8 y el TNFα se conjugó con el dominio VL del scFv de F8. Se espera, basándose en estos resultados, que un conjugado tendría las mismas o similares propiedades de selección de tumores como diana y/o eficacia terapéutica y/o actividad de destrucción celular si tanto la IL2 como un factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, se conjugaran con el dominio VH del anticuerpo. Como una alternativa adicional, por tanto, la IL2 y el factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, pueden estar unidos al extremo C-terminal del dominio VL del anticuerpo, por ejemplo, en formato scFv, mediante un ligador peptídico. Como una alternativa aún más adicional, la IL2 y el factor de necrosis tumoral, preferiblemente TNFα, pueden estar unidos al extremo N-terminal del dominio VH del anticuerpo, por ejemplo, en formato scFv, mediante un ligador peptídico. En los últimos dos conjugados, la IL2 y el TNFα pueden estar en cualquier orden y/o pueden estar unidos opcionalmente el uno al otro mediante un ligador peptídico. En el presente documento se describen ligadores peptídicos adecuados.

El conjugado de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. En esta divulgación, el conjugado puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

Alternativamente, el conjugado de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 39. En esta divulgación, el conjugado puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39.

El conjugado de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 41. En esta divulgación, el conjugado puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 41.

El conjugado de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 42. En esta divulgación, el conjugado puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42.

El conjugado de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 43. En esta divulgación, el conjugado puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43.

El conjugado de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 44. En esta divulgación, el conjugado puede tener al menos el 70 %, más preferiblemente uno de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44.

Sin estar limitado por ninguna explicación teórica, se espera que un conjugado según la presente divulgación que comprende TNFα formará un homotrímero en disolución ya que se conoce que el TNFα soluble se homotrimeriza. Un conjugado trimérico de este tipo comprendería tres moléculas de IL2 activa por una molécula de TNF activo (en estructura trimérica). Esto puede ser ventajoso, ya que las inmunocitocinas basadas en IL2 se usan normalmente en la clínica a mayores dosis en comparación con las inmunocitocinas basadas en TNFα. Por tanto, los conjugados de la divulgación pueden tener propiedades ventajosas con respecto a los regímenes de administración.

Ácidos nucleicos

También se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un conjugado según la presente divulgación. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender ADN y/o ARN, y pueden ser parcial o completamente sintéticas. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Además, se dan a conocer constructos en forma de plásmidos, vectores (por ejemplo, vectores de expresión), casetes de transcripción o expresión que comprenden tales ácidos nucleicos. Pueden elegirse o construirse los vectores adecuados que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémido, o virales, por ejemplo, 'fago, según sea apropiado. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel *et al*. (1999) 4ª eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.

Células huésped

También se da a conocer una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos tal como se describió anteriormente. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, sistemas de levaduras y baculovirus, y plantas y animales transgénicos.

Un conjugado según la presente divulgación puede producirse usando una célula huésped recombinante de este tipo. El método de producción puede comprender expresar un ácido nucleico o constructo tal como se describió anteriormente. La expresión puede lograrse convenientemente cultivando la célula huésped recombinante en condiciones apropiadas para la producción del conjugado. Tras la producción, el conjugado puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea apropiado. El conjugado puede formularse en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes. La expresión de anticuerpos, incluyendo conjugados de los mismos, en células procariotas está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo, Plückthun (1991), Bio/Technology 9: 545-551. Un huésped bacteriano común es *E. coli.*

La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de conjugados, por ejemplo, Chadd *et al*. (2001), Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194); Andersen *et al*. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117; Larrick y Thomas (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418. Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma NS0 de ratón, células de mieloma YB2/0 de rata, células embrionarias de riñón humanas, células embrionarias de retina humanas, y muchas otras.

También se describe un método que comprende introducir un ácido nucleico o constructo dado a conocer en el presente documento en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para

células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. La introducción de un ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota, puede usar un sistema viral o basado en plásmidos. El sistema de plásmidos puede mantenerse de manera episómica o puede incorporarse en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser o bien al azar o bien mediante integración dirigida de una o más copias en un solo locus o en múltiples. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

El ácido nucleico o constructo puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede realizarse mediante inclusión de secuencias que fomentan la recombinación con el genoma, según técnicas convencionales.

Aislado

Se refiere al estado en el que los conjugados dados a conocer en el presente documento, los anticuerpos para su uso en la divulgación en el presente documento o el ácido nucleico que codifica para tales conjugados serán generalmente según la presente divulgación. Por tanto, los conjugados dados a conocer en el presente documento, los anticuerpos para su uso en la divulgación en el presente documento o el ácido nucleico que codifica para tales conjugados pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, del entorno en el que se preparan (tal como cultivo celular), en forma sustancialmente pura u homogénea, o en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico distinto al de la secuencia que codifica para un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y ácidos nucleicos aislados estarán libres o sustancialmente libres de material con el que se encuentran en el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo.* Los conjugados y ácidos nucleicos específicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y, aún con fines prácticos, pueden aislarse por ejemplo, los miembros pueden mezclarse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en terapia. Los conjugados específicos pueden estar glicosilados, o bien de manera natural o bien mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden no estar glicosilados (por ejemplo, si se producen mediante expresión en una célula procariota).

También pueden usarse en la divulgación preparaciones heterólogas de conjugados. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de conjugados que comprenden moléculas de anticuerpo con cadenas pesadas y cadenas ligeras de longitud completa que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como ciclización de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.

Fibronectina

La fibronectina es un antígeno sujeto a corte y empalme alternativo, y se conocen varias isoformas alternativas de fibronectina, incluyendo alternativamente la isoforma sometida a corte y empalme A-FN que comprende el dominio ED-A, un marcador de angiogénesis conocido. Una molécula de anticuerpo, tal como se hace referencia en el presente documento, puede unirse selectivamente a isoformas de fibronectina expresadas selectivamente en la neovasculatura. Una molécula de anticuerpo puede unirse a la isoforma A-FN de fibronectina, por ejemplo, puede unirse al dominio ED-A (dominio extra A).

El dominio extra A (EDA o ED-A) de fibronectina también se conoce como ED, repetición A extra de tipo III (EIIIA) o EDI. La secuencia de ED-A humano se ha publicado por Kornblihtt *et al*. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868 y Paolella *et al*. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557. La secuencia de ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (fibronectina tipo III 12; dominio extra 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P02751. La secuencia de ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (fibronectina tipo III 13; dominio extra 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P11276.

La isoforma de ED-A de fibronectina (A-FN) contiene el dominio extra A (ED-A). La secuencia de la A-FN humana puede deducirse a partir de la secuencia precursora de fibronectina humana correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P02751. La secuencia de la A-FN de ratón puede deducirse a partir de la secuencia precursora de fibronectina de ratón correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P11276. La A-FN puede ser la isoforma de ED-A humana de fibronectina. El ED-A puede ser el dominio extra A de fibronectina humana.

El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) mediante corte y empalme alternativo y se ubica entre los dominios 11 y 12 de FN (Borsi *et al*. (1987), J. Cell. Biol., 104, 595-600). El ED-A está principalmente ausente en la forma plasmática de FN, pero es abundante durante la embriogénesis, la remodelación tisular, la fibrosis, el trasplante cardiaco y el crecimiento de tumores sólidos.

Cáncer

El cáncer, tal como se hace referencia en el presente documento, puede ser un cáncer que expresa, o ha demostrado que expresa, un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como un componente de la matriz extracelular asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos. Preferiblemente, el cáncer es un cáncer que expresa, o ha demostrado que expresa, la isoforma de ED-A de fibronectina. Por ejemplo, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer sólido o no sólido o linfoma maligno. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de piel (en particular melanoma), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de células germinales (tal como teratocarcinoma), cáncer de hígado, linfoma (tal como linfoma de Hodgkin o no Hodgkin), leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena aguda), cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de estómago y cáncer de cerebro. Los cánceres pueden ser hereditarios o esporádicos. Los cánceres pueden ser metastásicos o no metastásicos. Preferiblemente, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón y un sarcoma. La referencia a un cáncer, tal como se mencionó anteriormente, se refiere normalmente a una transformación maligna de las células en cuestión. Por tanto, cáncer de riñón, por ejemplo, se refiere a una transformación maligna de células en el riñón. El cáncer puede estar ubicado en su ubicación primaria, tal como el riñón en el caso de cáncer de riñón, o en una ubicación distante en el caso de metástasis. Un tumor, tal como se hace referencia en el presente documento, puede ser el resultado de cualquiera de los cánceres mencionados anteriormente. Preferiblemente, un tumor es el resultado de un melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón o un sarcoma. Un tumor que es el resultado de un cáncer particular incluye tanto un tumor primario como metástasis tumorales de dicho cáncer. Por tanto, un tumor que es el resultado de un cáncer de cabeza y cuello, por ejemplo, incluye tanto un tumor primario de cabeza y cuello como cáncer y metástasis de cáncer de cabeza y cuello encontrados en otras partes del cuerpo de un paciente.

Tratamiento

Se espera que los conjugados dados a conocer en el presente documento tengan actividad antitumoral y, por tanto, encuentren aplicación en el tratamiento de cáncer. Sin estar limitado por ninguna explicación teórica, se espera que los conjugados dados a conocer en el presente documento muestren una potente actividad antitumoral como resultado de excelentes propiedades de selección de tumores como diana, tal como se demuestra en el ejemplo 5 a continuación. Por tanto, los conjugados dados a conocer en el presente documento están diseñados para su uso en métodos de tratamiento de pacientes, preferiblemente pacientes humanos. Los conjugados, en particular, pueden usarse en el tratamiento de cáncer.

Por consiguiente, se dan a conocer métodos de tratamiento que comprenden la administración de un conjugado según la presente divulgación, composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados y el uso de conjugados de este tipo en la fabricación de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un método de elaboración de un medicamento o una composición farmacéutica que comprende formular el conjugado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien y se adaptarán por el experto en la técnica en función de la naturaleza y del modo de administración del/de los compuesto(s) activo(s) elegido(s).

Los conjugados según la divulgación se administrarán habitualmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además de la molécula de anticuerpo. Por tanto, las composiciones farmacéuticas tal como se describe en el presente documento, y para su uso según la presente divulgación, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser mediante inyección, por ejemplo, intravenosa o subcutánea. Preferiblemente, el conjugado de la divulgación se administra por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Aquellos de habilidad relevante en la técnica pueden preparar bien disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Pueden emplearse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según se requiera. Los expertos en la técnica conocen muchos métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Una composición que comprende un conjugado puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos

contra el cáncer, de manera concurrente o secuencial, o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, puede usarse un conjugado en combinación con un agente terapéutico existente para el cáncer.

Puede usarse un conjugado en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración por separado o combinada a un individuo y, por consiguiente, puede comprender el conjugado y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones por separado. Las preparaciones por separada pueden usarse para facilitar la administración por separado y secuencial o simultánea, y permiten la administración de los componentes por vías diferentes.

Las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse a mamíferos, preferiblemente seres humanos. La administración puede ser en una “cantidad terapéuticamente eficaz”, siendo esta suficiente para mostrar beneficio para un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. Por tanto, “tratamiento” de una enfermedad especificada se refiere a la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y el transcurso temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que va a tratarse, el paciente particular que va a tratarse, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de conjugado, el método de administración, la pauta de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., se encuentra dentro de la responsabilidad de los médicos de cabecera y otros doctores médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de la enfermedad que va a tratarse. En la técnicas se conocen bien las dosis apropiadas de anticuerpo (Ledermann *et al.* (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; y Bagshawe *et al.* (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Pueden usarse las dosificaciones específicas indicadas en el presente documento, o en el vademécum (2003), según sea apropiado para el tipo de medicamento que va a administrarse. Una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis adecuada de un conjugado para su uso en la divulgación puede determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de experimentación a seres humanos. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o tratamiento, el tamaño y la ubicación del área que va a tratarse, la naturaleza precisa del conjugado. Una dosis de conjugado típica estará en el intervalo de 100 μg a 1 g para aplicaciones sistémicas. Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguido por una o más dosis menores. Esta es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse de manera proporcional para niños y lactantes, y también ajustarse según el formato del conjugado en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanales o mensuales, a la discreción del médico. Los tratamientos pueden ser de cada dos a cuatro semanas para administración subcutánea y de cada cuatro a ocho semanas para administración intravenosa. En alguna divulgación en el presente documento, el tratamiento es periódico, y el periodo entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo, de aproximadamente tres semanas o más, de aproximadamente cuatro semanas o más o de aproximadamente una vez al mes. En otra divulgación en el presente documento, el tratamiento puede proporcionarse antes y/o después de cirugía, y puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Cromatografía de exclusión molecular

Se analizó el conjugado muIL2-F8-muTNFα purificado (SEQ ID NO: 16) en un sistema ÄKTA-FPLC con una columna Superdex 200 HR 10/30. El análisis de filtración en gel reveló dos picos tal como se muestra en la figura 1. El pico con el volumen de retención de 11,5 ml correspondía a una fracción trimérica del conjugado, que se recogió para experimentos adicionales (es decir, biodistribución; véase a continuación). La fracción trimérica comprendía trímeros del conjugado muIL2-F8-muTNFα, formados por asociación de tres moléculas de TNFα para formar una proteína trimérica. El pico a un volumen de retención de 9,9 ml representa una especie multimérica no covalente del conjugado.

Ejemplo 2 - Análisis de SDS-PAGE

Se caracterizó el conjugado muIL2-F8-muTNFα purificado mediante análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras, confirmando la presencia de una única banda de peso molecular aparente igual a 62 kDa tal como se muestra en la figura 2. Este peso molecular corresponde al peso molecular esperado del conjugado muIL2-F8-muTNFα.

Ejemplo 3 - ELISA

Se inmovilizó el dominio 11-EDA-12 biotinilado de fibronectina, que incluye el epítopo reconocido por scFv(F8), en una placa recubierta con estreptavidina (StreptaWell, Roche Applied Bioscience). Se usaron tres sistemas de detección diferentes, y permitió la evaluación de la expresión de los diferentes componentes del conjugado muIL2-

F8-muTNFα. Se usó proteína A conjugada con peroxidasa del rábano (GE Healthcare) para detectar el dominio VH del scFv(F8). Con el fin de detectar IL2, se usó un anticuerpo monoclonal de rata contra hu-IL2 (eBioscience), mientras que para detectar TNFα, se usó un anticuerpo monoclonal de rata contra mu-TNFα (eBioscience); ambos de estos anticuerpos se detectaron con un conjugado de peroxidasa con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata (Sigma-Aldrich). La reacción enzimática se detectó usando el sustrato BluePOD (Roche Diagnostics) seguido por la medición de la absorbancia fotométrica a 450 nm. La figura 3 muestra que pudieron detectarse todos los constituyentes del conjugado muIL2-F8-muTNFα (es decir, IL2, TNFα y el scFv F8) en las tres diluciones sometidas a prueba y, por tanto, estaban presentes en el conjugado tal como se esperaba. Los factores de dilución se muestran debajo del eje de abscisas en la figura 3.

Ejemplo 4 - Análisis de BIAcore

Se midió la afinidad de unión del conjugado muIL2-F8-muTNFα a través de análisis de resonancia de plasmón superficial (sistema BIAcore® 3000, GE Healthcare) usando un chip microsensor CM5 recubierto con 11-EDA-12. Se filtró el muIL2-F8-muTNFα a través de filtros de 0,22 μm y se inyectaron 30 μl en el sistema con una velocidad de flujo de 10 μl/min. Los resultados mostrados en la figura 4 demuestran que el conjugado conserva la capacidad de unirse al dominio extra A (EDA) de fibronectina, el antígeno relacionado del anticuerpo scFv F8.

Ejemplo 5 - Análisis de biodistribución

Se evaluó el rendimiento de dirrecionamiento *in vivo* del conjugado muIL2-F8-muTNFα mediante análisis de biodistribución. Se purificó la fracción homotrimérica de muIL2-F8-muTNFα mediante cromatografía de exclusión molecular tal como se describió en el ejemplo 1 anterior, y luego se sometió a tratamiento con yodo radiomarcado. Se inyectaron 5 μg/2 μCi de conjugado marcado con ^{125}I en la vena de la cola de ratones 129SvEv inmunocompetentes que portaban teratocarcinomas murinos F9 implantados por vía subcutánea (s.c.). Se sacrificaron los ratones 24 h después de la inyección. Se pesaron los órganos y se contó la radiactividad con un contador Packard Cobra gamma. El contenido radiactivo de órganos representativos se expresó como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g). La figura 5 muestra que el conjugado muIL2-F8-muTNFα se acumuló selectivamente en los tumores, con valores de porcentaje promedio de dosis inyectada por gramo (% de DI/g) de 9,5, que representan una tasa de incorporación del 38 %. Los resultados de selección de tumores como diana obtenidos con el conjugado muIL2-F8-muTNFα fueron mejores que aquellos notificados previamente para los conjugados F8-IL2 y F8-TNFα (Hemmerle *et al.*, 2013, Journal of Biotechnology, 172, 73-76; Pasche y Neri, 2012, Drug Discovery Today, doi:10.1016/j.drudis.2012.01.007). Específicamente, Hemmerle *et al.* (2013) muestran en la figura 2 que el conjugado F8-TNFα logró un % de DI/g de aproximadamente 3,5 en el mismo modelo de ratón de teratocarcinomas murinos F9. De manera similar, Pasche y Neri (2012) notifican en la figura 2 que la selección de tumores como diana de los conjugados F8-IL2, cuando se somete a prueba en un modelo de cáncer diferente, no fue muy buena, tal como se indicó por "+". De hecho, las razones de tumor con respecto a órgano observadas 24 horas después de la administración intravenosa con el conjugado muIL2-F8-muTNFα estaban entre las mejores notificadas hasta ahora para cualquier agente terapéutico basado en anticuerpos.

Ejemplo 6 - Actividad terapéutica

Se comparó la eficacia terapéutica del conjugado muIL2-F8-muTNFα en ratones que portaban tumores con la eficacia terapéutica observada con la administración combinada de los conjugados F8-muTNFα y F8-muIL2.

Se inyectaron por vía subcutánea ratones Balb/C de ocho semanas de edad con $5x10^6$ células de sarcoma murino Wehi-164. Se monitorizaron los ratones diariamente y se midió el volumen tumoral con un calibre (volumen = longitud x ancho^2 x 0,5). Se comenzó el tratamiento cuando los tumores alcanzaron un volumen de 80 mm^3. Se registró el peso corporal de los ratones diariamente, y el cambio de peso corporal se muestra en la figura 6B como la media (± EEM), n = 5 ratones por grupo.

A los ratones se inyectaron i.v. tres veces, con 48 h de diferencia (véanse las flechas negras en la figura 6) o bien PBS (control negativo), 5,6 μg de muIL2-F8-muTNFα o bien 4 μg de F8-muTNFα en combinación con 4 μg de F8-muIL2. Las cantidades de los conjugados administrados se seleccionaron para garantizar que cada ratón recibía cantidades equimolares de IL2 y TNFα. Los datos mostrados en la figura 6A representan la media (± EEM) de los volúmenes tumorales, n= 5 ratones por grupo.

La actividad antitumoral, es decir, la eficacia del tratamiento, observada para el tratamiento con muIL2-F8-muTNFα fue comparable a la actividad antitumoral observada con la administración combinada de F8-muTNFα y F8-muIL2 (véase la figura 6A).

Además, el perfil de toxicidad observado con el tratamiento con muIL2-F8-muTNFα fue muy superior al observado con la administración combinada de F8-muTNFα y F8-muIL2 (véase la figura 6B), tal como se demuestra por la pérdida de peso reducida observada. Los ratones tratados con la combinación de conjugados tuvieron que

sacrificarse después de once días de tratamiento como resultado de una grave pérdida de peso, mientras que aquellos tratados con el tratamiento con muIL2-F8-muTNFα mantuvieron un peso aceptable hasta el final del estudio en el día 16. Esto demuestra que el tratamiento con muIL2-F8-muTNFα se tolera mejor que el tratamiento con F8-muTNFα y F8-muIL2.

Ejemplo 7 - Efecto del formato del conjugado sobre la actividad de destrucción celular

Para someter a prueba la importancia del formato del conjugado sobre la actividad de destrucción celular, se sometió a prueba la actividad de diferentes formatos de proteínas de fusión en un ensayo de destrucción celular que empleó la línea celular de sarcoma de ratón WEHI-164. El ensayo se realizó en presencia de actinomicina D 2 μg/ml (Sigma-Aldrich). Se sembraron las células (30.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos en el medio de cultivo complementado con concentraciones crecientes de F8-mTNFα (SEQ ID NO: 47), mIL2-F8-mTNFα (SEQ ID NO: 17), mTNFα-F8-mIL2 (SEQ ID NO: 45) o F8-mIL2-mTNFα (SEQ ID NO: 46), tal como se indica en la figura 7. El anticuerpo F8 estaba en formato scFv en todos los conjugados sometidos a prueba. Después de 24 h a 37ºC, se determinó la viabilidad celular usando la disolución Cell Titer Aqueous One (Promega). Los resultados se muestran en la figura 7. Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad celular en comparación con células tratadas con actinomicina D sola (usada como control negativo). Los resultados demuestran que la actividad de destrucción celular de los diferentes formatos del conjugado sometidos a prueba fue comparable, tal como puede observarse a partir de los valores de CE_{50} notificados en la figura 7. El valor de CE_{50} representa la concentración de fármaco requerida para una mitad de actividad máxima. No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores de CE_{50} de los diferentes formatos del conjugado. El valor de R^2 para cada valor de CE_{50} también se notifica en la figura 7. Cuanto más próximo a 1 esté R^2, mayor es la fiabilidad de los datos. Los datos en la figura 7 muestran un patrón de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) y la línea de regresión se ajustó usando el software estadístico PRISM.

Lista de secuencias

Secuencia de aminoácidos del conjugado huIL2-F8-huTNFα [forma soluble] (SEQ ID NO: 1)

La secuencia de aminoácidos del conjugado huIL2-F8-huTNFα [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - TNFα humano [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas. El TNFα humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNFα.

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL
AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGA
SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVL
TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT
LTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVVAN
PQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQT
KVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

Secuencia de aminoácidos del dominio VH de F8 (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos del ligador que une el dominio VH de F8 al dominio VL de F8 (SEQ ID NO: 3)

GGGGSGGGGSGGGG

Secuencia de aminoácidos del dominio VL de F8 (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos del scFv de F8 (SEQ ID NO: 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLT
QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

Secuencias de aminoácidos de las CDR de F8

VH de la CDR1 de F8 - LFT (SEQ ID NO: 6)

VH de la CDR2 de F8 - SGSGGS (SEQ ID NO: 7)

VH de la CDR3 de F8 - STHLYL (SEQ ID NO: 8)

VL de la CDR1 de F8 - MPF (SEQ ID NO: 9)

VL de la CDR2 de F8 - GASSRAT (SEQ ID NO: 10)

VL de la CDR3 de F8 - MRGRPP (SEQ ID NO: 11)

Secuencia de aminoácidos de IL2 humana (huIL2) en los conjugados huIL2-F8-huTNFα (SEQ ID NO: 12)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL
AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

Secuencia de aminoácidos del ligador que une: huIL2 al dominio VH de F8 en los conjugados huIL2-F8-huTNFα, huTNFα al dominio VH de F8 en los conjugados huTNFα-F8-huIL2, y huTNFα a huIL2 en los conjugados F8-huIL2-huTNFα (SEQ ID NO: 13)

GDGSSGGSGGAS

Secuencia de aminoácidos del ligador que une: huTNFα al dominio VL de F8 en los conjugados huIL2-F8-huTNFα, huIL2 al dominio VL de F8 en los conjugados huTNFα-F8-huIL2, y huIL2 al dominio VL de F8 en los conjugados F8-huIL2-huTNFα (SEQ ID NO: 14)

SSSSGSSSSGSSSSG

Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular de TNFα humano (huTNFα) (SEQ ID NO: 15)

VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC
PSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDY
LDFAESGQVYFGIIAL

Secuencia de aminoácidos del conjugado muIL2-F8-muTNFα (SEQ ID NO: 16)

La secuencia de aminoácidos del conjugado muIL2-F8-muTNFα (IL2 murina - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - TNFα murino) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELK
DLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAF
CQSIISTSPQGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLE
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVT
VSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYG
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSS
SGLRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKG

QGCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCPKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVN LPKYLDFAESGQVYFGVIAL

Secuencia de aminoácidos de IL2 murina (muIL2) en el conjugado muIL2-F8-muTNFα (SEQ ID NO: 17)

APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELK DLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAF CQSIISTSPQ

Secuencia de aminoácidos del ligador que une muIL2 al dominio VH de F8 en el conjugado muIL2-F8-muTNFα (SEQ ID NO: 18)

GDGSSGGSGGAS

Secuencia de aminoácidos del ligador que une muTNFα al dominio VL de F8 en el conjugado muIL2-F8-muTNFα (SEQ ID NO: 19)

SSSSGSSSSGSSSSG

Secuencia de aminoácidos de TNFα murino (muTNFα) en el conjugado muIL2-F8-muTNFα (SEQ ID NO: 20)

LRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKGQG CPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCPKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLP KYLDFAESGQVYFGVIAL

Secuencia de aminoácidos de las CDR de L19

VH de la CDR1 de L19 - Ser Phe Ser Met Ser (SEQ ID NO: 21)

VH de la CDR2 de L19 - Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys (SEQ ID NO: 22)

VH de la CDR3 de L19 - Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 23)

VL de la CDR1 de L19 - Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala (SEQ ID NO: 24)

VL de la CDR2 de L19 - Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr (SEQ ID NO: 25)

VL de la CDR3 de L19 - Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 26)

Secuencia de aminoácidos del dominio VH de L19 (SEQ ID NO: 27)

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Ser

Secuencia de aminoácidos del dominio VL de L19 (SEQ ID NO: 28)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Secuencia de aminoácidos de scFv(L19) (SEQ ID NO: 29)

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Secuencia de aminoácidos de las CDR de F16

VH de la CDR1 de F16 - RYGMS (SEQ ID NO: 30)

VH de la CDR2 de F16 - AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 31)

VH de la CDR3 de F16 - AHNAFDY (SEQ ID NO: 32)

VL de la CDR1 de F16 - QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 33)

VL de la CDR2 de F16 - GKNNRPS (SEQ ID NO: 34)

VL de la CDR3 de F16 - NSSVYTMPPVV (SEQ ID NO: 35)

Secuencia de aminoácidos del dominio VH de F16 (SEQ ID NO: 36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSR

Secuencia de aminoácidos del dominio VL de F16 (SEQ ID NO: 37)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT
ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLG

Secuencia de aminoácidos del scFv(F16) (SEQ ID NO: 38)

La secuencia de ligador del dominio VH y VL se muestra subrayada.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSRGGGSGGGSGGSSELTQDPA
VSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA
EDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLG

Secuencia de aminoácidos del conjugado huIL2-F8-huTNFα [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 39)

La secuencia de aminoácidos del conjugado huIL2-F8-huTNFα [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - TNFα humano [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas. El TNFα humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNFα.

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL
AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGA
SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVL
TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT
LTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQA
VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC
PSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDY
LDFAESGQVYFGIIAL

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de TNFα humano (huTNFα) (SEQ ID NO: 40)

GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLV
VPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG
GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

Secuencia de aminoácidos del conjugado huTNFα [forma soluble]-F8-huIL2 (SEQ ID NO: 41)

La secuencia de aminoácidos del conjugado huTNFα [forma soluble]-F8-huIL2 (TNFα humano [forma soluble] - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - IL2 humana) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC
PSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDY
LDFAESGQVYFGIIALGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAP
GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAP
RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSS
SSGSSSSGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL
KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

Secuencia de aminoácidos del conjugado huTNFα [dominio extracelular]-F8-huIL2 (SEQ ID NO: 42)

La secuencia de aminoácidos del conjugado huTNFα [dominio extracelular]-F8-huIL2 (TNFα humano [dominio extracelular] - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - IL2 humana) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLV
VPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG
GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIALGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS
QSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGR
PPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK
FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFCQSIISTLT

Secuencia de aminoácidos del conjugado F8-huIL2-huTNFα [forma soluble] (SEQ ID NO: 43)

La secuencia de aminoácidos del conjugado F8-huIL2-huTNFα [forma soluble] (VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - IL2 humana - ligador - TNFα humano [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLT
QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL
QMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL
ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASVRSSSRTPSDKPVAHVVANP
QAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTK
VNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

Secuencia de aminoácidos del conjugado F8-huIL2-huTNFα [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 44)

La secuencia de aminoácidos del conjugado F8-huIL2-huTNFα [dominio extracelular] (VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - IL2 humana - ligador - TNFα humano [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLT
QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL
QMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL
ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASGPQREEFPRDLSLISPLAQA
VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC
PSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDY
LDFAESGQVYFGIIAL

Secuencia de aminoácidos del conjugado muTNFα-F8-muIL2 (SEQ ID NO: 45)

La secuencia de aminoácidos del conjugado muTNFα-F8-muIL2 (TNFα murino - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - IL2 murina) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

LRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKGQG
CPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCPKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLP
KYLDFAESGQVYFGVIALGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVR
QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDY
WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPG
QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSS
GSSSSGSSSSGAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTF
KFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESA
TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ

Secuencia de aminoácidos del conjugado F8-muIL2-muTNFα (SEQ ID NO: 46)

La secuencia de aminoácidos del conjugado F8-muIL2-muTNFα (VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - IL2 murina - ligador - TNFα murino) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLT
QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQ
QQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQS
KSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGDGSSGGSGGA
SLRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKGQ
GCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCPKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNL
PKYLDFAESGQVYFGVIAL

Secuencia de aminoácidos del conjugado F8-muTNFα (SEQ ID NO: 47)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLT
QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGLRSSSQNSSDKPVAHVVANH
QVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKGQGCPDYVLLTHTVSRFAISYQEK
VNLLSAVKSPCPKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL

Lista de secuencias

<110> PHILOGEN S.P.A.

<120> Inmunoconjugados de IL2 y TNF

<130> TEK/FP7195233

<150> documento GB1507908.0
<151> 08-05-2015

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 557

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado huIL2-F8-huTNF alfa [forma soluble]

<400> 1

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1               5                   10                  15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20                  25                  30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
        35                  40                  45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50                  55                  60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65                  70                  75                  80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85                  90                  95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100                 105                 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
        115                 120                 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
    130                 135                 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
```

145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
165 170 175

Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
275 280 285

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
290 295 300

Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
305 310 315 320

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
325 330 335

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
340 345 350

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
355 360 365

Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
370 375 380

Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
385 390 395 400

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
405 410 415

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
420 425 430

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
435 440 445

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
450 455 460

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
465 470 475 480

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
485 490 495

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
500 505 510

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
515 520 525

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
530 535 540

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
545 550 555

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del dominio VH de F8

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del ligador que une el dominio VH de F8 al dominio VL de F8

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del dominio VL de F8

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

```
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
                85                  90                  95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 5
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del scFv de F8

<400> 5

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
            20                  25                  30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145                 150                 155                 160

Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
                165                 170                 175
```

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met
210 215 220

Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225 230 235 240

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR1 de F8 sintética

<400> 6

Leu Phe Thr
1

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR2 de F8 sintética

<400> 7

Ser Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR3 de F8 sintética

<400> 8

Ser Thr His Leu Tyr Leu
1 5

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR1 de F8 sintética

<400> 9

Met Pro Phe
1

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR2 de F8 sintética

<400> 10

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR3 de F8 sintética

<400> 11

Met Arg Gly Arg Pro Pro
1 5

<210> 12
<211> 133
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

```
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85                  90                  95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100                 105                 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
        115                 120                 125

Ile Ser Thr Leu Thr
    130
```

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del ligador que une: huIL2 al dominio VH de F8 en los conjugados huIL2-F8-huTNF alfa, huTNF alfa al dominio VH de F8 en los conjugados huTNF alfa-F8-huIL2, y huTNF alfa al huIL2 en los conjugados F8-huIL2-huTNF alfa

<400> 13

```
Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
1               5                   10
```

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del ligador que une: huTNF alfa al dominio VL de F8 en los conjugados huIL2-F8-huTNF alfa, huIL2 al dominio VL de F8 en los conjugados huTNF alfa-F8-huIL2, y huIL2 al dominio VL de F8 en los conjugados F8-huIL2-huTNF alfa

<400> 14

```
Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
1               5                   10                  15
```

<210> 15
<211> 157
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1               5                   10                  15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
```

20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 16
<211> 572
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado muIL2-F8-muTNF alfa

<400> 16

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln
1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu
20 25 30

Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu
35 40 45

Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala
50 55 60

Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu

65 70 75 80

Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp
85 90 95

Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys
100 105 110

Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr
115 120 125

Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile
130 135 140

Ser Thr Ser Pro Gln Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
180 185 190

Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
195 200 205

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
210 215 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
225 230 235 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245 250 255

Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
290 295 300

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
305 310 315 320

```
Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
                325                 330                 335

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
            340                 345                 350

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
        355                 360                 365

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
    370                 375                 380

Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
385                 390                 395                 400

Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
                405                 410                 415

Leu Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
            420                 425                 430

Val Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg
        435                 440                 445

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu
    450                 455                 460

Val Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe
465                 470                 475                 480

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser
                485                 490                 495

Arg Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val
            500                 505                 510

Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro
        515                 520                 525

Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
    530                 535                 540

Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala
545                 550                 555                 560

Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
                565                 570
```

<210> 17

<211> 149
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln
1               5                   10                  15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu
            20                  25                  30

Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu
        35                  40                  45

Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala
    50                  55                  60

Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu
65                  70                  75                  80

Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys
            100                 105                 110

Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr
        115                 120                 125

Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Pro Gln
145
```

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del ligador que une muIL2 al dominio VH de F8 en el conjugado muIL2-F8-muTNF alfa

<400> 18

```
Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
1               5                   10
```

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del ligador que une muTNF alfa al dominio VL de F8 en el conjugado mulL2-F8- muTNF alfa

<400> 19

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
1 5 10 15

<210> 20
<211> 156
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 20

Leu Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1 5 10 15

Val Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg
20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val
85 90 95

Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro
100 105 110

Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
115 120 125

Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala
130 135 140

Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR1 de L19 sintética

<400> 21

Ser Phe Ser Met Ser
1 5

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR2 de L19 sintética

<400> 22

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR3 de L19 sintética

<400> 23

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR1 de L19 sintética

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR2 de L19 sintética

<400> 25

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR3 de L19 sintética

<400> 26

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 27
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del dominio VH de L19

<400> 27

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del dominio VL de L19

<400> 28

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
                85                  90                  95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 29
<211> 236
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos de scFv(L19)

<400> 29

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            20                  25                  30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
        115                 120                 125

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    130                 135                 140

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
145                 150                 155                 160

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
                165                 170                 175

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
            180                 185                 190

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
        195                 200                 205

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
    210                 215                 220

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225                 230                 235
```

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR1 de F16 sintética

<400> 30

```
Arg Tyr Gly Met Ser
1               5
```

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR2 de F16 sintética

<400> 31

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de la CDR3 de F16 sintética

<400> 32

Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR1 de F16 sintética

<400> 33

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR2 de F16 sintética

<400> 34

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de la CDR3 de F16 sintética

<400> 35

Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
1 5 10

<210> 36
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del dominio VH de F16

<400> 36

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Arg
        115
```

<210> 37
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del dominio VL de F16

<400> 37

```
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1               5                   10                  15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
```

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 38
<211> 235
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del scFv(F16)

<400> 38

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
115 120 125

```
Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val
    130                 135                 140

Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys
                165                 170                 175

Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu
        195                 200                 205

Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
    210                 215                 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225                 230                 235
```

<210> 39
<211> 577
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado huIL2-F8-huTNF alfa [dominio extracelular]

<400> 39

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1               5                   10                  15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20                  25                  30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
        35                  40                  45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50                  55                  60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65                  70                  75                  80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85                  90                  95
```

```
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100                 105                 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
        115                 120                 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
    130                 135                 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
                165                 170                 175

Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
            180                 185                 190

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
        195                 200                 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
    210                 215                 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225                 230                 235                 240

Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
                245                 250                 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
        275                 280                 285

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
    290                 295                 300

Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
305                 310                 315                 320

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
                325                 330                 335

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
```

340 345 350

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
355 360 365

Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
370 375 380

Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
385 390 395 400

Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
405 410 415

Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
420 425 430

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
435 440 445

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
450 455 460

Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
465 470 475 480

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
485 490 495

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
500 505 510

Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
515 520 525

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
530 535 540

Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
545 550 555 560

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
565 570 575

Leu

<210> 40

<211> 177
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

```
Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
1               5                  10                  15

Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
            20                  25                  30

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
        35                  40                  45

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
    50                  55                  60

Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
65                  70                  75                  80

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
                85                  90                  95

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
            100                 105                 110

Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
        115                 120                 125

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
    130                 135                 140

Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
                165                 170                 175

Leu
```

<210> 41
<211> 557
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado huTNF alfa [forma soluble]-F8-huIL2

<400> 41

```
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1               5                  10                  15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
            20                  25                  30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
        35                  40                  45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
                85                  90                  95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
            100                 105                 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
        115                 120                 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
    130                 135                 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu Gly Asp Gly
145                 150                 155                 160

Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
                165                 170                 175

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
            180                 185                 190

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln
        195                 200                 205

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly
    210                 215                 220

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
225                 230                 235                 240
```

```
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
                245                 250                 255

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr
            260                 265                 270

Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val
    290                 295                 300

Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
305                 310                 315                 320

Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala
                325                 330                 335

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly
            340                 345                 350

Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
        355                 360                 365

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
    370                 375                 380

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe
385                 390                 395                 400

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
                405                 410                 415

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys
            420                 425                 430

Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
        435                 440                 445

Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu
    450                 455                 460

Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu
465                 470                 475                 480

Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu
                485                 490                 495
```

Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn
500 505 510

Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met
515 520 525

Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
530 535 540

Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
545 550 555

<210> 42
<211> 577
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado huTNF alfa [dominio extracelular]-F8-huIL2

<400> 42

Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
1 5 10 15

Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
20 25 30

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
35 40 45

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
50 55 60

Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
85 90 95

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
100 105 110

Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
115 120 125

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
130 135 140

```
Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
                165                 170                 175

Leu Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser Glu Val Gln
            180                 185                 190

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
        195                 200                 205

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe Thr Met Ser
    210                 215                 220

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile
225                 230                 235                 240

Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
                245                 250                 255

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
            260                 265                 270

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser
        275                 280                 285

Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
    290                 295                 300

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
                325                 330                 335

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met
            340                 345                 350

Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
        355                 360                 365

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
    370                 375                 380

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
385                 390                 395                 400
```

```
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg
                405                 410                 415

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser
            420                 425                 430

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala Pro Thr Ser
        435                 440                 445

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
    450                 455                 460

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
465                 470                 475                 480

Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
                485                 490                 495

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
            500                 505                 510

Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
        515                 520                 525

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
    530                 535                 540

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
545                 550                 555                 560

Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
                565                 570                 575

Thr
```

<210> 43
<211> 557
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado F8-huIL2-huTNF alfa [forma soluble]

<400> 43

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
            20                  25                  30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145                 150                 155                 160

Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
                165                 170                 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
            180                 185                 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met
    210                 215                 220

Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225                 230                 235                 240

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
```

```
            260                 265                 270

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
        275                 280                 285

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
    290                 295                 300

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
305                 310                 315                 320

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
                325                 330                 335

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
            340                 345                 350

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
        355                 360                 365

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
    370                 375                 380

Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
385                 390                 395                 400

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
                405                 410                 415

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
            420                 425                 430

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
        435                 440                 445

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
    450                 455                 460

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
465                 470                 475                 480

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
                485                 490                 495

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
            500                 505                 510
```

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
515 520 525

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
530 535 540

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
545 550 555

<210> 44
<211> 577
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado F8-huIL2-huTNF alfa [dominio extracelular]

<400> 44

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160

```
Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
                165                 170                 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
            180                 185                 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met
    210                 215                 220

Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225                 230                 235                 240

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
            260                 265                 270

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
        275                 280                 285

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
    290                 295                 300

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
305                 310                 315                 320

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
                325                 330                 335

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
            340                 345                 350

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
        355                 360                 365

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
    370                 375                 380

Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
385                 390                 395                 400

Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
                405                 410                 415
```

```
Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
            420                 425                 430

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
        435                 440                 445

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
    450                 455                 460

Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
465                 470                 475                 480

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
                485                 490                 495

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
            500                 505                 510

Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
        515                 520                 525

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
    530                 535                 540

Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
545                 550                 555                 560

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
                565                 570                 575

Leu
```

<210> 45
<211> 572
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado muTNF alfa-F8-mulL2

<400> 45

```
Leu Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1               5                   10                  15

Val Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg
            20                  25                  30
```

```
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu
        35                  40                  45

Val Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val
                85                  90                  95

Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro
            100                 105                 110

Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
        115                 120                 125

Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala
    130                 135                 140

Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu Gly Asp Gly Ser
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            180                 185                 190

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
        195                 200                 205

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly
    210                 215                 220

Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
225                 230                 235                 240

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                245                 250                 255

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu
            260                 265                 270

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        275                 280                 285
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu
    290                 295                 300

Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
305                 310                 315                 320

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp
                325                 330                 335

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
            340                 345                 350

Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
        355                 360                 365

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe
    370                 375                 380

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly
385                 390                 395                 400

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
                405                 410                 415

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser
            420                 425                 430

Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
        435                 440                 445

Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg
    450                 455                 460

Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys
465                 470                 475                 480

Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu
                485                 490                 495

Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser
            500                 505                 510

Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg
        515                 520                 525

Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln
```

530 535 540

Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile
545 550 555 560

Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
565 570

<210> 46
<211> 572
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado F8-muIL2-muTNF alfa

<400> 46

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160

Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

```
                165                 170                 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
            180                 185                 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met
    210                 215                 220

Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225                 230                 235                 240

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln
            260                 265                 270

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met
        275                 280                 285

Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys
    290                 295                 300

Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr
305                 310                 315                 320

Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg
                325                 330                 335

His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala
            340                 345                 350

Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly
        355                 360                 365

Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val
    370                 375                 380

Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
385                 390                 395                 400

Thr Ser Pro Gln Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
                405                 410                 415
```

Leu Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
420 425 430

Val Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg
435 440 445

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu
450 455 460

Val Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe
465 470 475 480

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser
485 490 495

Arg Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val
500 505 510

Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro
515 520 525

Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
530 535 540

Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala
545 550 555 560

Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
565 570

<210> 47
<211> 411
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética de aminoácidos del conjugado F8-muTNF alfa

<400> 47

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145                 150                 155                 160

Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
                165                 170                 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
            180                 185                 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met
    210                 215                 220

Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225                 230                 235                 240

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Leu
                245                 250                 255

Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
            260                 265                 270

Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala
        275                 280                 285

Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val
    290                 295                 300
```

```
Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys
305                 310                 315                 320

Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg
                325                 330                 335

Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys
            340                 345                 350

Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp
        355                 360                 365

Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp
    370                 375                 380

Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu
385                 390                 395                 400

Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
                405                 410
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende interleucina-2 (IL2), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y un Fv de cadena sencilla (scFv) que se une al dominio extra A (ED-A) de fibronectina.

2. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el scFv comprende un sitio de unión a antígeno que tiene las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11.

3. La proteína de fusión según la reivindicación 2, en la que el scFv comprende los dominios VH y VL del anticuerpo F8 expuestos en las SEQ ID NO: 2 y 4.

4. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el dominio VH y el dominio VL del scFv están unidos por un ligador de 14 a 20 aminoácidos.

5. La proteína de fusión según las reivindicaciones 2 a 4, en la que el scFv tiene, o comprende, la secuencia de aminoácidos de scFv F8 expuesta en SEQ ID NO: 5.

6. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la IL2 es IL2 humana.

7. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el TNFα es TNFα humano.

8. La proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que la IL2 comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12.

9. La proteína de fusión según la reivindicación 7, en la que el TNFα comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15 o la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 40.

10. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la IL2 está unida al scFv mediante un ligador peptídico y/o el TNFα está unido al scFv mediante un ligador peptídico.

11. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

(i) en la que la IL2 está unida al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y el TNFα está unido al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico; o

(ii) en la que el TNFα está unido al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y la IL2 está unida al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico; o

(iii) en la que la IL2 y el TNFα están unidos al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico.

12. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en la que el ligador peptídico es de 10 a 20 aminoácidos de longitud.

13. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, u 11(i), en la que la proteína de fusión tiene, o comprende, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 39.

14. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, u 11(ii), en la que la proteína de fusión tiene, o comprende, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42.

15. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, u 11(iii), en la que la proteína de fusión tiene, o comprende, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

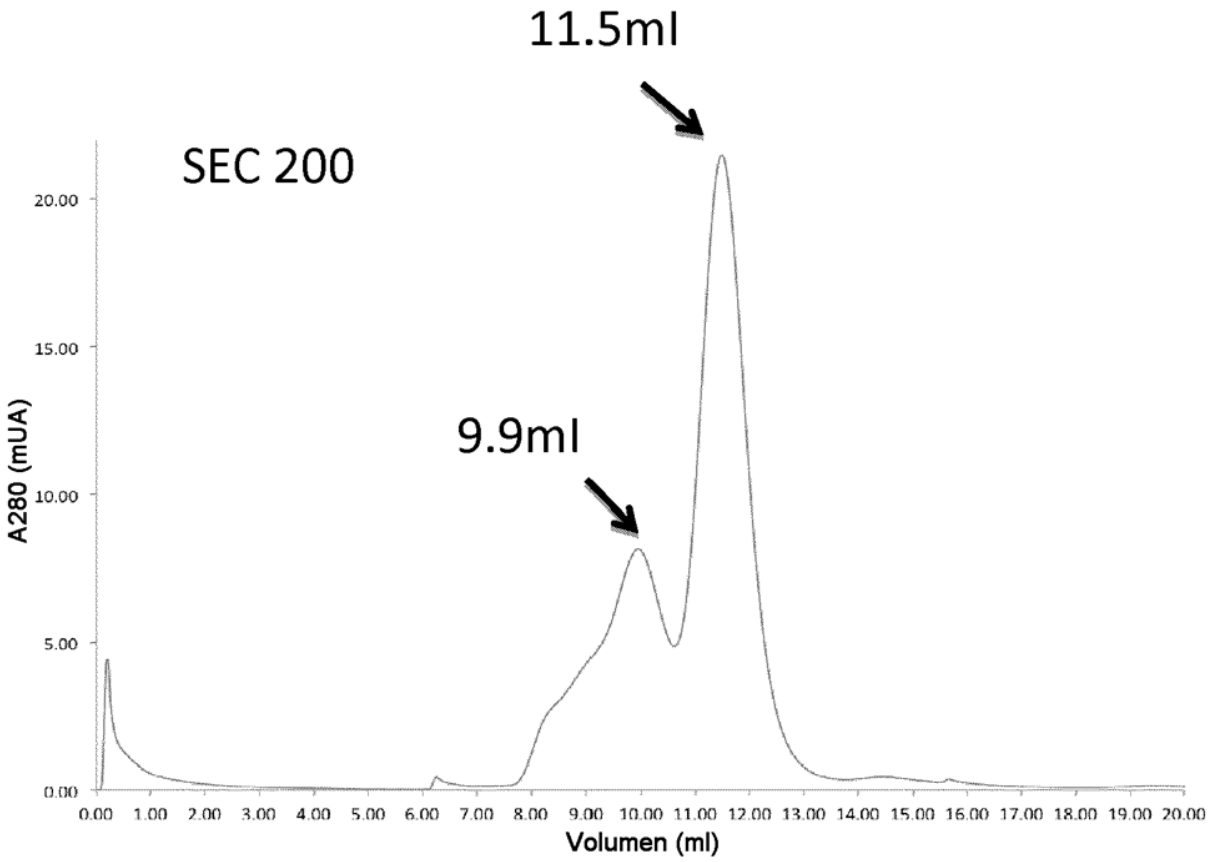

11.5ml
SEC 200
9.9ml
A280 (mUA)
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
0.00 1.00 2.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00 14.00 15.00 16.00 17.00 18.00 19.00 20.00
Volumen (ml)

Figura 1

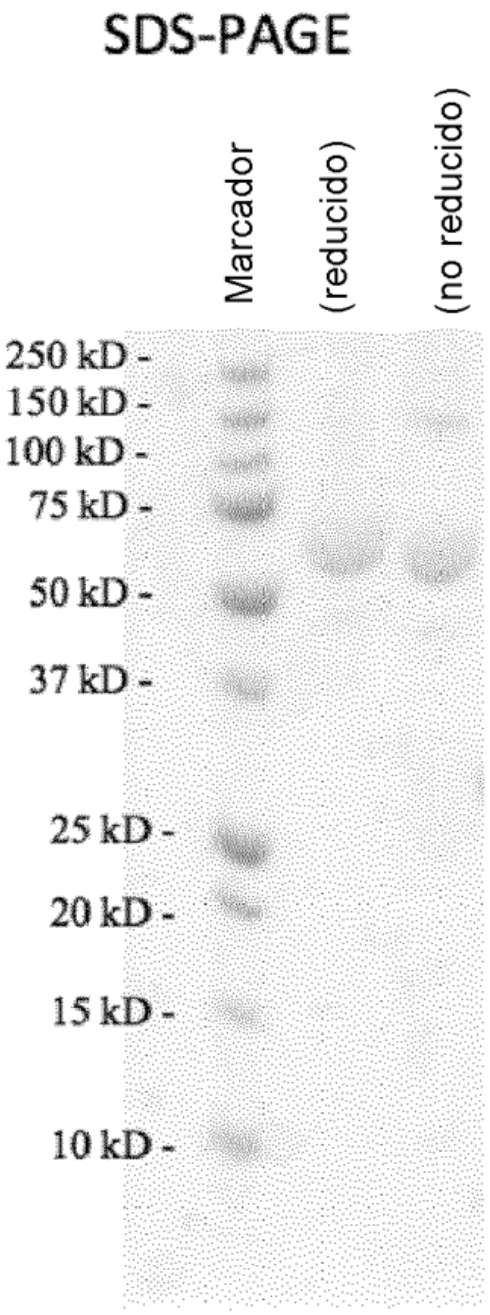

SDS-PAGE
Marcador
(reducido)
(no reducido)
250 kD -
150 kD -
100 kD -
75 kD -
50 kD -
37 kD -
25 kD -
20 kD -
15 kD -
10 kD -

Figura 2

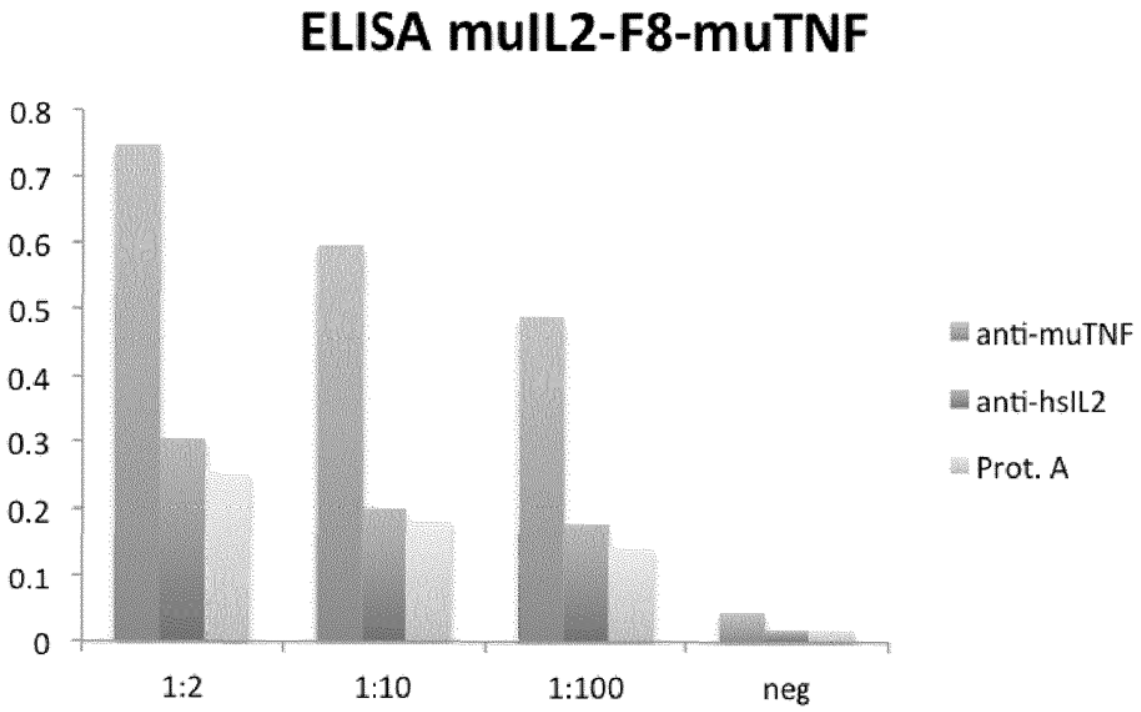

ELISA muIL2-F8-muTNF
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1:2
1:10
1:100
neg
anti-muTNF
anti-hsIL2
Prot. A

Figura 3

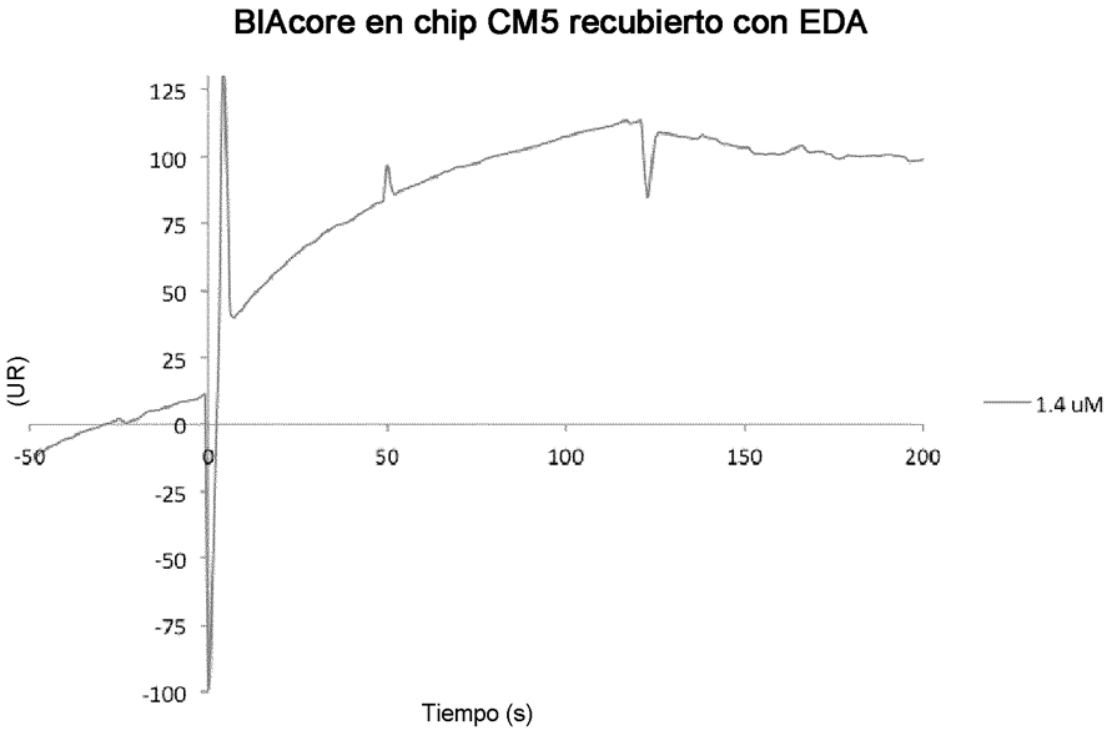

BIAcore en chip CM5 recubierto con EDA
125
100
75
50
25
0
-25
-50
-75
-100
(UR)
-50
0
50
100
150
200
Tiempo (s)
1.4 uM

Figura 4

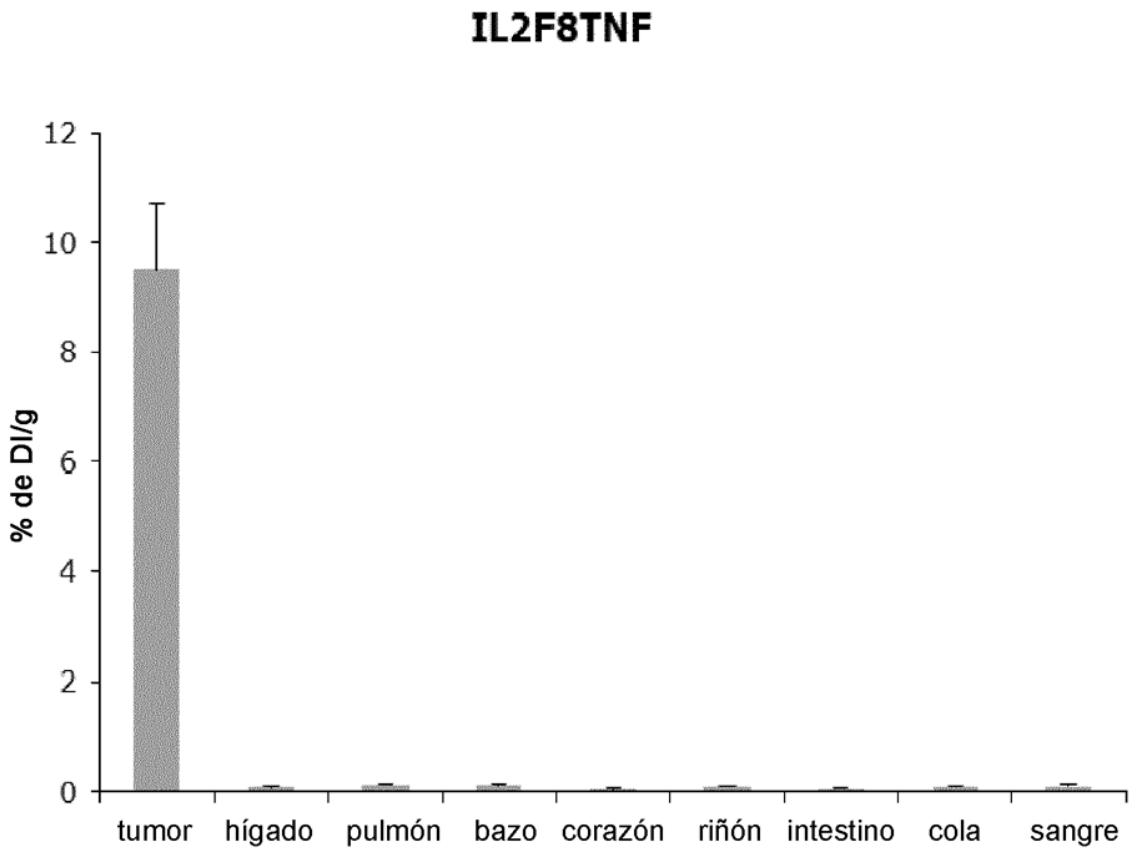

IL2F8TNF
% de DI/g
12
10
8
6
4
2
0
tumor
hígado
pulmón
bazo
corazón
riñón
intestino
cola
sangre

Figura 5

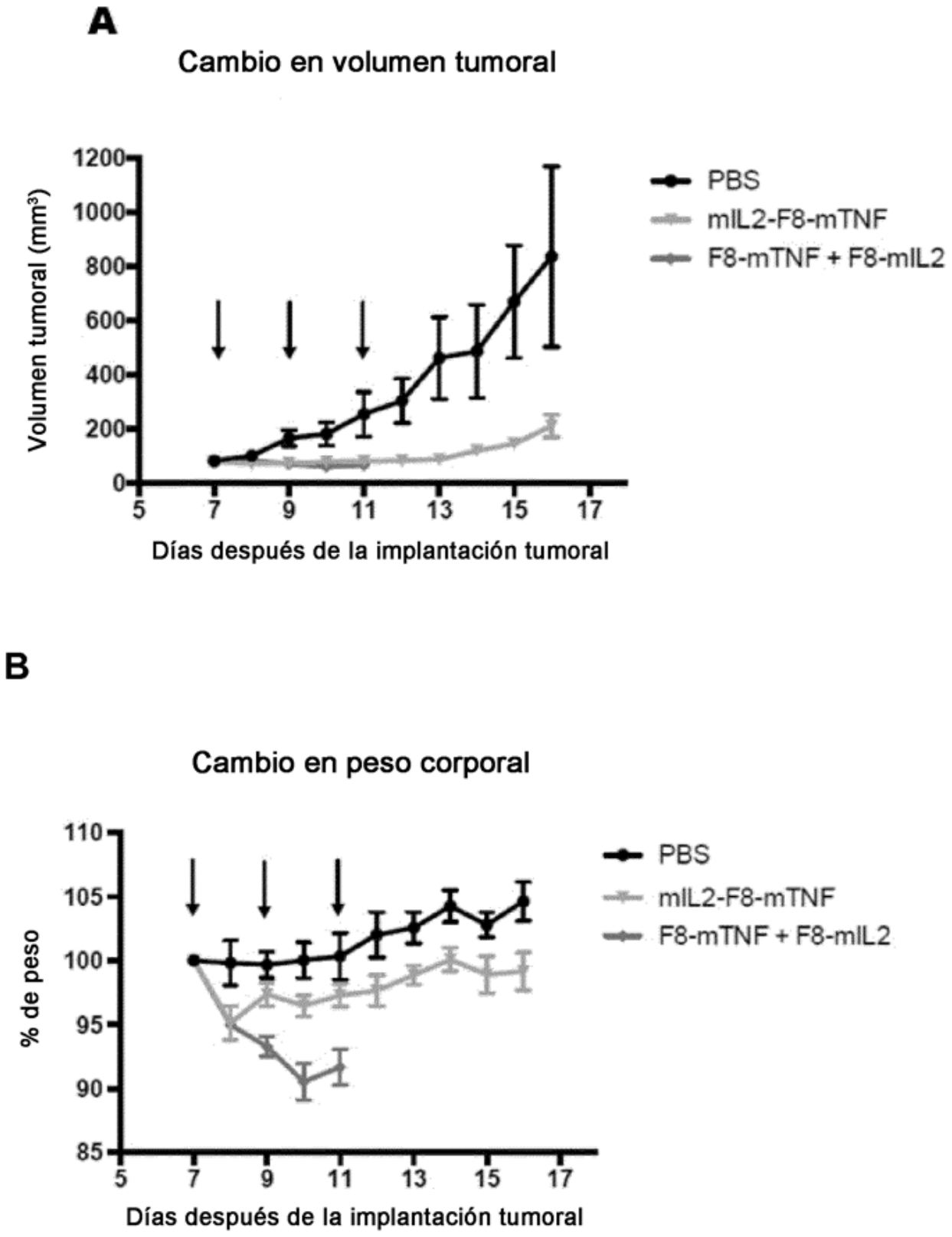
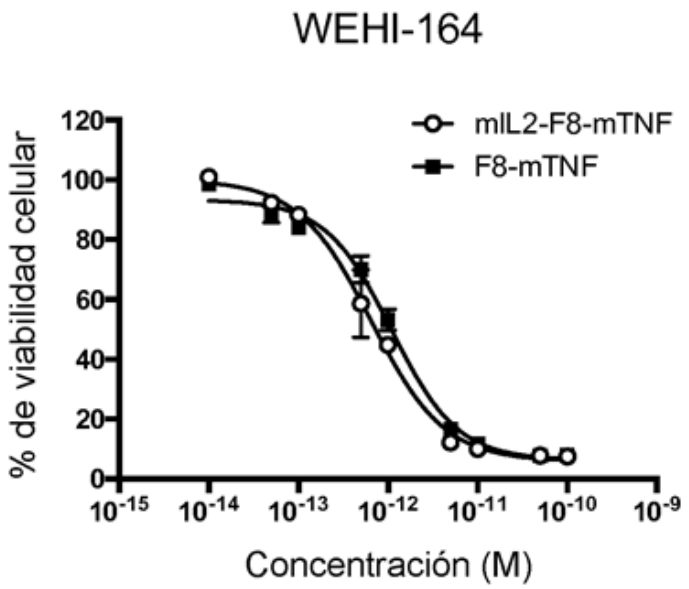

A
Cambio en volumen tumoral
Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
5
7
9
11
13
15
17
Días después de la implantación tumoral
PBS
mIL2-F8-mTNF
F8-mTNF + F8-mIL2
B
Cambio en peso corporal
% de peso
110
105
100
95
90
85
5
7
9
11
13
15
17
Días después de la implantación tumoral
PBS
mIL2-F8-mTNF
F8-mTNF + F8-mIL2

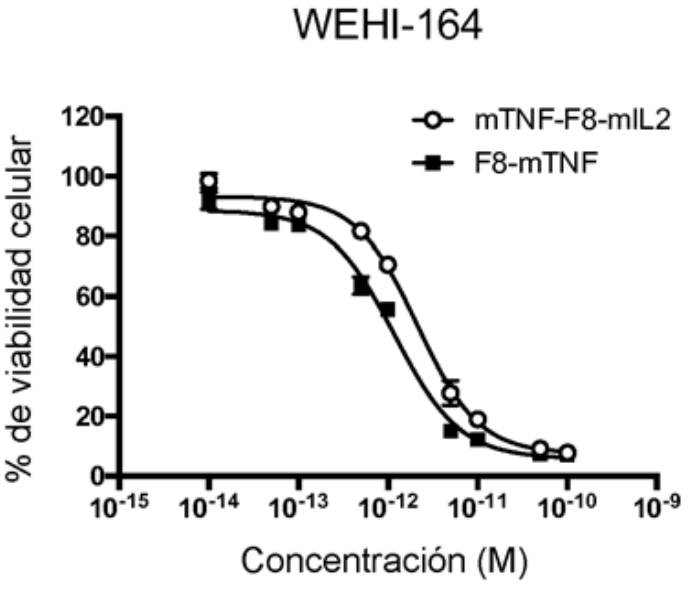
Figura 6

A



	mIL2-F8-mTNF	F8-mTNF
CE_{50}	0.64pM	1.1pM
R^2	0.9901	0.9912

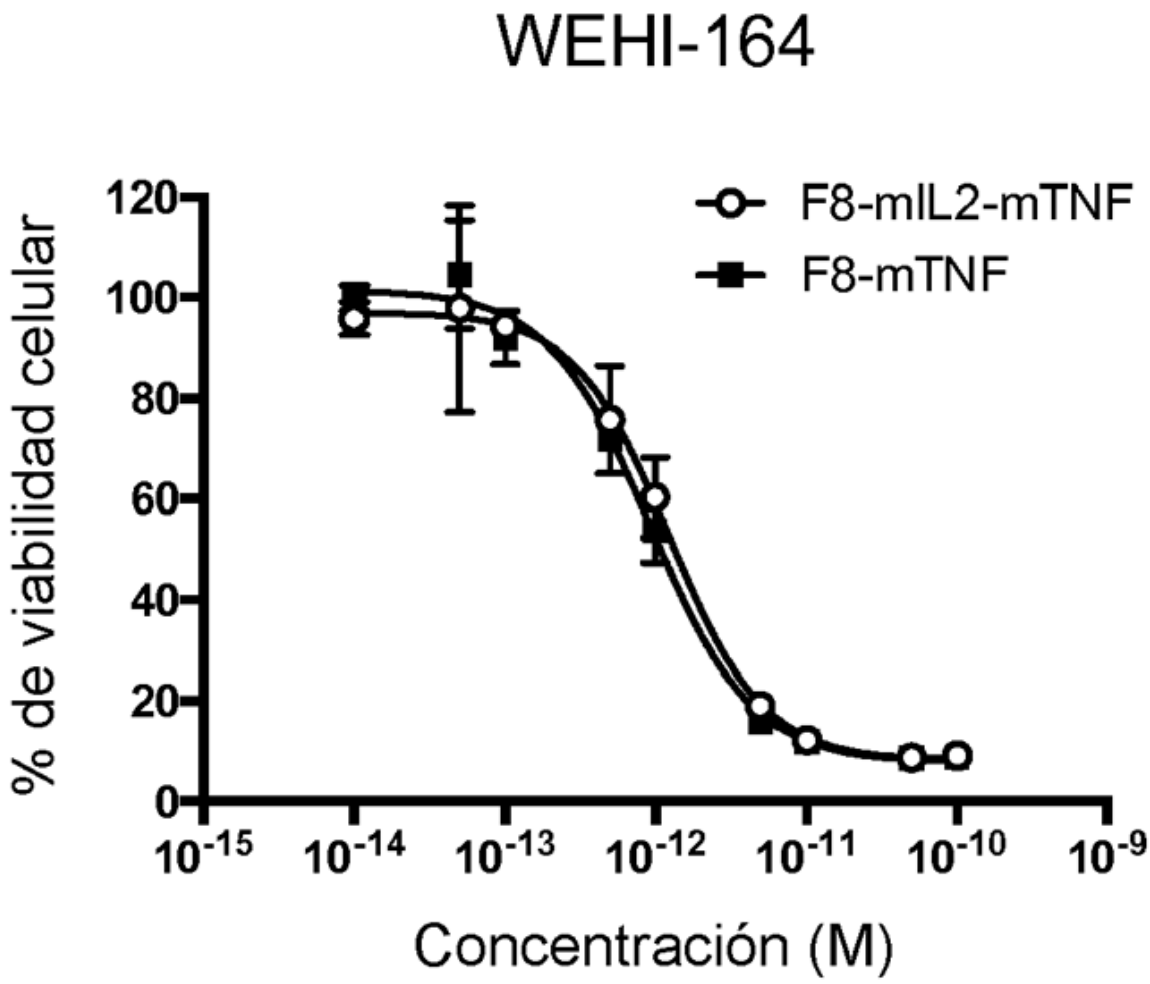
B



	mTNF-F8-mIL2	F8-mTNF
CE_{50}	2.1pM	1.1pM
R^2	0.9935	0.9929

Figura 7

C



	F8-mIL2-mTNF	F8-mTNF
CE_{50}	1.2pM	0.92pM
R^2	0.9681	0.9866

Figura 7, continuación