

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 893 249**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 47/66 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2017 PCT/EP2017/078652**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018 WO18087172**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2017 E 17801386 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3538547**

(54) Título: **Inmunoconjungados que comprenden IL-2, anticuerpo anti-fibronectina y TNF-alfa mutante**

(30) Prioridad:

**09.11.2016 GB 201618888
11.08.2017 GB 201712916**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**NERI, DARIO;
DE LUCA, ROBERTO y
WULHFARD, SARAH**

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 893 249 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoconjungados que comprenden IL-2, anticuerpo anti-fibronectina y TNF-alfa mutante

5 **Campo**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden interleucina 2 (IL2), un factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) mutante y una molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo se une a fibronectina, tal como el extra dominio A (EDA) y el extra dominio B (EDB) de fibronectina. Las proteínas de fusión pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes**

15 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 alentadores resultados en modelos animales, sólo algunas citocinas, tales como Proleukin 1 (IL2), Roferon A1 (interferón alfa-2a [IFN α 2a]), Intron A1 (IFN α 2b), Beromun 1 (TNF α recombinante), han sido aprobadas como fármacos contra el cáncer. Las indicaciones actuales para las citocinas incluyen cáncer metastásico de células renales, melanoma maligno, tricoleucemia, linfoma mieloide crónico, sarcoma y mieloma múltiple. Las citocinas pueden administrarse o bien solas o bien en combinación con quimioterapia.

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

25 En un intento por aumentar el índice terapéutico de determinadas citocinas, se han propuestos las 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 activa de citocina es responsable de la actividad terapéutica (Pasche y Neri, 2012, Drug Discov. Today, 17, 583). Determinadas inmunocitocinas basadas en cargas activas proinflamatorias (tales como IL2, IL4, IL12 y TNF α) presentan una potente actividad contra el cáncer 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 malignas hematológicas (Eigenthaler *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 EDA sometido a corte y empalme alternativo de fibronectina, un marcador de la angiogénesis tumoral; Rybak *et al.* (2007) Cancer Res. 67, 10948-10957) se ha usado para la selección de tumores como diana, tanto solo como fusionado con cualquiera de TNF o 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).

40 45 Se han notificado constructos que comprenden tres copias de una única citocina modificada de la superfamilia de TNF que tiene actividad reducida hacia su receptor (documento WO2015/007903). Los constructos se administran específicamente a células diana mediante un resto de direccionamiento. Las citocinas modificadas usadas en estos constructos incluyen TNF mutante con un intervalo de actividad de entre el 0,02% y el 5% de TNF de tipo natural, incluyendo de TNF mutantes con las sustituciones Y87Q, I97S, Y115A, Y87F, Y115G o I97A. También se notifica el efecto de R32G.

50 55 En algunos casos, las inmunocitocinas pueden mediar la eliminación del tumor en modelos de ratón de cáncer cuando se usan como agentes únicos (Gutbrodt *et al.*, 2013, Sci. Transl. Med. 5, 201-204]. En la mayoría de los casos, sin embargo, un único producto de inmunocitocina no puede inducir la completa eliminación del cáncer. Sin embargo, se han notificado curas contra 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).

60 65 Además, se han usado varias combinaciones de inmunocitocinas en terapia. Por ejemplo, los conjugados L19-IL2 y L19-TNF α pudieron curar el neuroblastoma en un modelo de ratón completamente singénico de la enfermedad, mientras que las inmunocitocinas individuales usadas como agentes únicos no dieron como resultado la eliminación de la enfermedad (Balza *et al.*, 2010, Int. J. Cancer, 127, 101). La combinación de cargas activas de IL2 y TNF α también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos. Se mostró 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). Pretto *et al.* (2014, Cancer Immunol. Immunother. 63(9), 901-

910) dan a conocer el uso combinado de F8-IL-2 y F8-TNF α para la reducción del volumen tumoral en un modelo de ratón de melanoma (figura 3). Además, dicha figura muestra la reducción de un tumor en un modelo murino de sarcoma usando L19-IL-2 y L19-TNF α . En el documento WO2013/045125 (exp. 1) se muestra la eficacia terapéutica de una combinación de L19-IL-2 y L19-TNF α . 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).

5 También ha habido intentos de generar "inmunocitocinas dobles", en las que un anticuerpo se fusiona genéticamente con dos citocinas diferentes. Por ejemplo, la interleucina-12 (IL12) y el TNF α se han incorporado en 10 una única entidad molecular. Sin embargo, estos intentos no han tenido éxito y no han conducido a programas de desarrollo clínico. Específicamente, se ha descrito una triple fusión, que consiste en: (i) el anticuerpo L19 en formato de scFv (específico para el dominio EDB sometido a corte y empalme alternativo de fibronectina, un marcador de la 15 angiogénesis tumoral); (ii) TNF α murino; y (iii) IL12 murina en formato de cadena sencilla (Halin *et al.*, 2003, *Cancer Res.*, 63, 3202-3210). Esta proteína de fusión pudo expresarse y purificarse hasta homogeneidad. La proteína de fusión también se unió al antígeno relacionado con alta afinidad y especificidad, sin embargo (a diferencia de L19-TNF α y L19-IL12), no pudo localizarse en tumores sólidos *in vivo*, tal como se evidencia mediante estudios de biodistribución cuantitativos en ratones que portan tumores. Por tanto, el comportamiento de las inmunocitocinas dobles *in vivo* es extremadamente impredecible.

20 También se han descrito proteínas de fusión de citocinas bifuncionales, en las que las citocinas se ligaron a un anticuerpo completo intacto (o la porción Fc de un anticuerpo) (Gillies *et al.*, 2002, *Cancer Immunol. Immunother.* 51, 449). Estas proteínas de fusión comprendían interleucina-2/interleucina-12 (IL2/IL12) o interleucina-4/factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (IL4/GM-CSF). La actividad de las citocinas se conservó en 25 los constructos en los que las citocinas se fusionaron en tandem con el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada (H) de Fc o anticuerpo, así como en constructos en los que una citocina se fusionó con el extremo carboxilo-terminal de la cadena H mientras que la segunda citocina se fusionó con el extremo amino-terminal de la región variable de cadena H o ligera (L). Se mantuvo la unión al antígeno de las proteínas de fusión anticuerpo-citocina. Sin embargo, se notificaron actividades terapéuticas *in vivo* únicamente para aplicaciones de terapia génica (es decir, células tumorales transfectadas con las inmunocitocinas IL2/IL12 apropiadas), pero no con proteínas terapéuticas. 30 No se notifican proteínas de fusión de citocinas bifuncionales que comprendan otros tipos de restos de direccionamiento.

35 La complejidad intrínseca de expresar con éxito inmunoconjungados que contienen dos citocinas diferentes en una única molécula (también denominados "inmunocitocinas dobles") y los resultados poco prometedores obtenidos con tales moléculas tal como se comentó anteriormente (por ejemplo, en Halin *et al.* (2003)), significan que estos formatos moleculares no se han continuado para aplicaciones clínicas.

Sumario

40 Los presentes inventores han reconocido que el uso de un mutante de factor de necrosis tumoral (TNF) con actividad reducida mejora la tolerabilidad de una inmunocitocina doble que comprende TNF y IL2, así como una molécula de anticuerpo de direccionamiento, sin afectar a la eficacia. La invención se refiere a una proteína de fusión que comprende interleucina-2 (IL2), un mutante de factor de necrosis tumoral (TNF α) humano y una molécula 45 de anticuerpo que se une a fibronectina, en la que el mutante de TNF α humano tiene actividad reducida en relación con el TNF α humano de tipo natural y comprende la secuencia de aminoácidos de TNF α de tipo natural, estando la R en una posición correspondiente a R32 de SEQ ID NO: 15 o R52 de SEQ ID NO: 17 sustituida por A, F o V; y en la que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv) o un diacuerpo.

50 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión tal como se definió anteriormente, 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.

55 La invención también proporciona la proteína de fusión tal como se definió anteriormente para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante el direccionamiento de IL2 y el mutante de TNF α a la neovasculatura *in vivo*, así como la proteína de fusión tal como se definió anteriormente para su uso en un método de administración de IL2 y el mutante de TNF α a la neovasculatura tumoral en un paciente.

Breve descripción de las figuras

60 La figura 1 muestra la actividad de destrucción celular del conjugado hullL2-F8-huTNF α y del conjugado mutante hullL2-F8-huTNF α (R32A). Los conjugados sometidos a prueba fueron hullL2-F8-huTNF α y hullL2-F8-huTNF α (R32A) que comprendía un TNF α mutado en la posición 32, IL2 y el anticuerpo anti-ED-A F8. La actividad de destrucción celular de este conjugado mutado se comparó con la actividad de destrucción celular observada en presencia del conjugado hullL2-F8-huTNF α . La actividad de destrucción celular del conjugado mutante hullL2-F8-huTNF α (R32A) fue inferior en comparación con el conjugado hullL2-F8-huTNF α , tal como puede observarse a partir

de los valores de CE50. El valor de CE50 representa la concentración de fármaco requerida para una actividad semimáxima.

La figura 2 muestra el rendimiento de direccionamiento *in vivo* del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) evaluado mediante análisis de biodistribución. El conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) se acumuló selectivamente en el tumor en un modelo de ratón de teratocarcinoma F9.

La figura 3 muestra el ensayo de actividad biológica de IL2 del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A), basándose en la proliferación de células CTLL-2.

La figura 4 muestra el ensayo de actividad biológica de TNF del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A), basándose en la destrucción de células HT-1080.

La figura 5 muestra el análisis de biodistribución cuantitativo del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) marcado con yodo radiactivo en ratones inmunocompetentes que portan tumores de teratocarcinoma F9.

Descripción detallada

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones, y se refiere a una proteína de fusión que comprende interleucina-2 (IL2), un mutante de factor de necrosis tumoral (TNF α) humano y una molécula de anticuerpo que se une a fibronectina, en la que el mutante de TNF α humano tiene actividad reducida en relación con el TNF α humano de tipo natural y comprende la secuencia de aminoácidos de TNF α de tipo natural, estando la R en una posición correspondiente a R32 de SEQ ID NO: 15 o R52 de SEQ ID NO: 17 sustituida por A, F o V; y en la que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv) o un diacuerpo.

El término "molécula de anticuerpo" describe una inmunoglobulina, ya sea natural o producida parcial o completamente de manera sintética. El término también se refiere a cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo pueden haberse aislado u obtenido mediante purificación a partir de fuentes naturales, o bien obtenerse mediante recombinación genética, o bien mediante síntesis química, y que pueden contener aminoácidos no naturales.

Dado que los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, debe considerarse que el término "molécula de anticuerpo" cubre cualquier sustancia o elemento 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 natural o producido parcial o completamente de manera sintética. Por tanto, se incluyen moléculas químéricas que comprenden un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, o equivalente, fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de anticuerpos químéricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en una gran cantidad de bibliografía posterior.

Tal como se mencionó anteriormente, los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. 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 un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados; (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están ligados mediante 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 WO93/11161); (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); y (x) un formato de diacuerpo de cadena sencilla en el que cada uno de los dominios VH y VL dentro de un conjunto está conectado mediante un ligador peptídico corto o 'no flexible'. Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que ligan los dominios VH y VL (Reiter *et al.* (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245). Un Fv de cadena sencilla (scFv) puede estar comprendido dentro de una mini-inmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP), por ejemplo, tal como se describe en (Li *et al.*, (1997), Protein Engineering, 10: 731-736). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada con el dominio CH4 de la isoforma secretora de IgE humana, IgE-S2 (ϵ_{S2} -CH4; Batista *et al.*, (1996), J. Exp. Med., 184: 2197-205), formando una molécula de anticuerpo de mini-inmunoglobulina homodimérica. 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 algunos residuos en el extremo carboxilo-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, 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 portan un grupo tiol libre.

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

- 5 Las moléculas de anticuerpo adecuadas para su uso en los conjugados descritos en el presente documento incluyen diacuerpos o, más preferiblemente, scFv. Los diacuerpos y scFv no comprenden una región Fc de anticuerpo, por lo que posiblemente se reducen los efectos de la reacción antiidiopática. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo para su uso en los conjugados descritos en el presente documento es un scFv.
- 10 Cuando la molécula de anticuerpo es un scFv, los dominios VH y VL del anticuerpo están ligados preferiblemente mediante un ligador de 10 a 20 aminoácidos, mediante un ligador de 14 a 20 aminoácidos, preferiblemente mediante un ligador de 10 a 14 aminoácidos. En la técnica se conocen ligadores adecuados y están disponibles para el experto. Por ejemplo, un ligador puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 51.
- 15 Cuando la molécula de anticuerpo es un diacuerpo, los dominios VH y VL pueden estar ligados 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 ligados mediante un ligador de 5 a 12 aminoácidos.
- 20 Los presentes inventores han mostrado que un conjugado que comprende IL2; un mutante de TNF α ; y una molécula de anticuerpo que se une al extra dominio A (ED-A) de fibronectina muestra una toxicidad reducida en comparación con un conjugado que comprende IL2; TNF α ; y una molécula de anticuerpo que se une al extra dominio A (ED-A) de fibronectina. Además, los presentes inventores también han mostrado que un conjugado que comprende IL2; un mutante de TNF α ; y una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma de extra dominio B (ED-B) de fibronectina muestra toxicidad reducida en comparación con el TNF α recombinante. Otros conjugados que comprenden IL2 y un mutante de TNF, preferiblemente TNF α , y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos tienen toxicidad reducida de manera similar.
- 25 La toxicidad de un conjugado que comprende un mutante de TNF tal como se describe en el presente documento se reduce en comparación con el conjugado correspondiente que comprende TNF de tipo natural. La toxicidad reducida puede incluir tolerabilidad mejorada en un paciente, por ejemplo, una reducción en uno o más síntomas adversos asociados con la administración del/de los conjugado(s) al paciente. Los síntomas adversos reducidos por la toxicidad pueden incluir adelgazamiento, náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, sofocos, urticaria, exantema, toxicidad pulmonar, disnea, hipotensión, anafilaxis, enfermedad del suero, creatinina aumentada, cefalea.
- 30 35 Además, la toxicidad reducida del mutante de TNF en el conjugado aumenta el efecto sinérgico del resto IL2, que puede administrarse a una dosis más alta debido a la menor actividad del mutante de TNF. Por tanto, las citocinas de potencia coincidente en el conjugado pueden ser útiles en aplicaciones terapéuticas.
- 40 Los presentes inventores también han mostrado que un conjugado que comprende IL2 y un mutante de TNF α ; y una molécula de anticuerpo que se une al extra dominio A (ED-A) de fibronectina puede seleccionar como diana con éxito la neovasculatura tumoral *in vivo*. Además, los presentes inventores también han mostrado que un conjugado que comprende IL2 y un mutante de TNF α ; y una molécula de anticuerpo que se une al extra dominio B (ED-B) de fibronectina puede seleccionar como diana con éxito la neovasculatura tumoral *in vivo*. Otros conjugados que comprenden IL2 y un mutante de TNF, preferiblemente TNF α , y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos serán igualmente adecuados para dirigir la IL2 y el mutante de TNF a la neovasculatura tumoral y, por tanto, hallarán aplicación en el tratamiento contra el cáncer. También han mostrado que un conjugado que comprende IL2; TNF α ; y una molécula de anticuerpo que se une al extra dominio A (ED-A) de fibronectina selecciona como diana la neovasculatura tumoral *in vivo* (documento WO2016/180715).
- 45 50 En la técnica se conocen muchos antígenos asociados con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, ya que son anticuerpos que pueden unirse a tales antígenos. Además, pueden generarse anticuerpos contra un antígeno dado usando métodos bien conocidos tales como los descritos en la presente solicitud. En alguna divulgación en el presente documento, el antígeno puede ser fibronectina, incluyendo la isoforma de extra dominio A (ED-A) de fibronectina (A-FN) o la isoforma de extra dominio B (ED-B) de fibronectina (B-FN). 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. En la técnica también se conocen anticuerpos que se unen al ED-B de fibronectina (y por tanto también al B-FN), e incluyen el anticuerpo L19, respectivamente. Se ha demostrado que los anticuerpos que se unen al ED-B de fibronectina, incluyendo el anticuerpo L19, pueden seleccionar como diana específicamente la neovasculatura tumoral *in vivo*. Por tanto, un conjugado descrito en el presente documento, que comprende IL2, un mutante de TNF, preferiblemente TNF α , y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, preferiblemente muestra una toxicidad reducida cuando se administra a un paciente, en comparación con la administración al paciente de un conjugado que comprende IL2, TNF y la molécula de anticuerpo.
- 55 60 65

En alguna divulgación preferida en el presente documento, una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento puede tener las CDR y/o los dominios VH y/o VL de los anticuerpos F8 o L19 descritos en el presente documento. Una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento tiene preferiblemente las CDR del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11. Más preferiblemente, un anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento puede comprender 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 tal como se describe en el presente documento 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 de scFv o diacuerpo, lo más preferiblemente en formato de scFv. Cuando el anticuerpo F8 está en formato de scFv, la molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

Otra molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento tiene preferiblemente las CDR del anticuerpo L19 expuestas en las SEQ ID NO: 18-23. Más preferiblemente, un anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento puede comprender los dominios VH y/o VL del anticuerpo L19 expuestos en las SEQ ID NO: 24 y 25. Aún más preferiblemente, un anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento comprende los dominios VH y VL del anticuerpo L19 expuestos en las SEQ ID NO: 24 y 25. El anticuerpo L19 está preferiblemente en formato de scFv o diacuerpo, lo más preferiblemente en formato de scFv. Cuando el anticuerpo L19 está en formato de scFv, la molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 26.

Una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento puede unirse a A-FN y/o al ED-A de fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo anti-ED-A F8, por ejemplo, en formato de scFv, o con una afinidad que es mejor. Una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento puede unirse a B-FN y/o al ED-B de fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo anti-ED-B L19, por ejemplo, en formato de scFv, o con una afinidad que es mejor.

Una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento puede unirse al mismo epítopo en A-FN y/o el ED-A de fibronectina que el anticuerpo anti-ED-A F8. Una molécula de anticuerpo de la presente divulgación puede unirse al mismo epítopo en B-FN y/o el ED-B de fibronectina que el anticuerpo anti-ED-B L19.

En la presente invención pueden producirse y usarse variantes de moléculas de anticuerpo dadas a conocer en el presente documento, que, en el sentido más amplio, son tal como se definen en las reivindicaciones. En general, las técnicas requeridas para realizar sustituciones dentro de las secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL de anticuerpo, en particular las regiones de entramado de los dominios VH y VL, y las moléculas de anticuerpo están disponibles en la técnica. Pueden elaborarse secuencias variantes, con sustituciones que puede predecirse o no que tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y someterse a prueba para determinar la capacidad de unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina, a B-FN y/o el ED-B 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 aminoácidos (adición, delección, 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 o a FN-B puede comprender las CDR y/o el dominio VH y/o VL del anticuerpo F8 o L19 descritos en el presente documento con 5 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 alteraciones de aminoácidos dentro de las CDR y/o el dominio VH y/o VL. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se une a FN-A o a FN-B puede comprender el dominio VH y/o VL del anticuerpo F8 o L19 descritos en el presente documento con 5 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 alteraciones de aminoácidos dentro de la región de entramado del dominio VH y/o VL. Por tanto, una molécula de anticuerpo que se une a FN-A o al ED-A de fibronectina, tal como se hace referencia en el presente documento, puede comprender 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 alteraciones de aminoácidos 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 al 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 al ED-A de fibronectina con una mayor 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. Por tanto, una molécula de anticuerpo que se une a FN-B o al ED-B de fibronectina, tal como se hace referencia en el presente documento, puede comprender el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 24 y/o el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 25 con 5 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 alteraciones de aminoácidos 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-B o al ED-B 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: 24 y el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 25, o puede unirse a la isoforma de ED-B o al ED-B de fibronectina con una mayor afinidad que una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 24 y el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 25.

- Una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento 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 sea aplicable, de los anticuerpos F8 o L19 expuestos en las SEQ ID NO: 2, 4, 24, 25, 33 y 34. Una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento 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 de los anticuerpos F8 o L19 expuestos en las SEQ ID NO: 5, 26, 35 y 46, respectivamente.
- Un sitio de unión a antígeno es la parte de una molécula que reconoce y se une a la totalidad o parte de un antígeno diana. En una molécula de anticuerpo, se refiere al sitio de unión a antígeno de anticuerpo o parátopo, y comprende la parte del anticuerpo que reconoce y se une a la totalidad 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. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo comprende preferiblemente una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.
- Un sitio de unión a antígeno puede proporcionarse por medio de reorganización de regiones determinantes de complementariedad (CDR). En general, la estructura para portar una CDR o un conjunto de CDR será 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 ubica en una ubicación correspondiente a la CDR o al conjunto de CDR de los dominios variables VH y VL de anticuerpo que se producen de manera natural codificados por genes de inmunoglobulina reorganizados. 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*. 4^a Edición. Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU.), y actualizaciones del mismo, ahora disponibles en internet (en immuno.bme.nwu.edu o buscar "Kabat" usando cualquier buscador).
- Se pretende que región CDR o CDR indique las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina tal como se define por Kabat *et al.* (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4^a Edición. Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU. (Kabat *et al.*, (1991a), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., 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" puede indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso todas, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítopo que reconoce.
- De 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 reorganización de los genes que dan lugar a la misma). Puede ser tan corta como de 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo 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).
- El sitio de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento tiene preferiblemente las CDR del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11 o las CDR de anticuerpo L19 expuestas en las SEQ ID NO: 18-23. Lo más preferiblemente, el sitio de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento tiene las CDR del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11 o las CDR de anticuerpo L19 expuestas en las SEQ ID NO: 18-23.
- En la técnica hay disponibles diversos métodos para obtener moléculas de anticuerpo contra un antígeno diana. Las moléculas de anticuerpo para su uso en los conjugados descritos en el presente documento son preferiblemente anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, químérico o humanizado, que pueden obtenerse según los métodos convencionales bien conocidos el experto en la técnica. Una molécula de anticuerpo para su uso en los conjugados descritos en el presente documento es lo más preferiblemente una molécula de anticuerpo humano.
- Es posible tomar anticuerpos monoclonales y de otro tipo y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químicas que se unen al antígeno diana. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica para la región variable de inmunoglobulina, o para las CDR, de una molécula de anticuerpo en las regiones constantes, o en las regiones constantes más las 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, lo que puede alterar o no la especificidad de unión de los

anticuerpos producidos.

Las técnicas disponibles en la técnica de ingeniería de anticuerpos han permitido aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden elaborarse hibridomas humanos tal como se describe por Kontermann y Dubel

5 (2001), S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545. La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar elementos de unión específicos, se ha descrito con detalle en muchas publicaciones, tales como el documento WO92/01047 (comentado adicionalmente a continuación) y en las patentes estadounidenses US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793,

10 US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001), S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545. Para aislar anticuerpos humanos pueden usarse ratones transgénicos, en los que los genes de anticuerpo de ratón se inactivan y reemplazan funcionalmente por genes de anticuerpo humano al tiempo que dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón (Mendez *et al.*, (1997), *Nature Genet*, 15(2): 146-156).

15 En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a 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.

20 Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra el antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN, B-FN, el ED-A de fibronectina o el ED-B 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 B-FN, o un fragmento de las mismas, o mediante síntesis de péptidos partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica de A-FN o B-FN y/o un fragmento de las mismas.

25 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.

30 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, el ED-A, B-FN o el ED-B, 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 ED-B, o un fragmento peptídico de los mismos, y seleccionando una o más moléculas de anticuerpo de la biblioteca que puedan unirse al antígeno.

35 Una biblioteca de anticuerpos puede seleccionarse usando exploración iterativa de colonias en filtros (ICFS). En la ICFS, se hacen crecer bacterias que contienen el ADN que codifica para varias especificidades de unión en un medio líquido y, una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, algunos miles de millones de las mismas se distribuyen sobre un soporte de crecimiento que consiste en un filtro de membrana pretratado de manera adecuada que se incuba hasta que aparecen colonias bacterianas completamente confluentes. Un segundo sustrato de trampa consiste en otro filtro de membrana, prehumidificado y cubierto con el antígeno deseado.

40 45 Después se coloca el filtro de membrana de trampa 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 apuntando hacia arriba. Se incuba la estructura intercalada así obtenida a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Por tanto, es posible obtener la expresión de los genes que codifican para fragmentos de anticuerpo, tales como scFv, que tienen una acción de extensión, de modo que quedan atrapados los fragmentos que se unen específicamente con el antígeno que está presente sobre la membrana de trampa. Después puede tratarse la membrana de trampa para identificar los fragmentos de anticuerpo unidos, tales como scFv, por ejemplo usando técnicas colorimétricas habitualmente usadas para este fin.

50 55 La posición de los fragmentos identificados, por ejemplo como manchas coloreadas, sobre el filtro de trampa permite volver a las colonias bacterianas correspondientes que están presentes sobre la membrana de crecimiento y producir los fragmentos de anticuerpo atrapados. Se agrupan y se hacen crecer las colonias, y las bacterias se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo, repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Después se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas sobre la membrana de trampa corresponden a colonias positivas únicas, representando cada una de ellas una posible fuente de fragmentos de anticuerpo monoclonal dirigidos contra el antígeno usado en la selección. La ICFS se describe, por ejemplo, en el documento WO02/46455.

60 65 Una biblioteca también puede presentarse en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables tales como partículas de bacteriófago (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 los mismos y, opcionalmente, también un dominio VL presentado si está presente. La presentación en fagos se describe en el documento WO92/01047 y, por ejemplo, en las patentes estadounidenses US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

5 Tras la selección de moléculas de anticuerpo que pueden unirse al antígeno y presentarse en partículas o complejos moleculares de bacteriófago u otras bibliotecas, el ácido nucleico puede tomarse 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 la 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.

10 15 La capacidad de unión a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN, B-FN, el ED-A o el ED-B de fibronectina, u otra isoforma o antígeno diana, puede someterse a prueba adicionalmente, por ejemplo la capacidad de competir con un anticuerpo específico para A-FN, B-FN, el ED-A o el ED-B de fibronectina, tal como el anticuerpo F8 o L19.

20 25 También pueden generarse regiones VH o VL novedosas que portan secuencias derivadas de CDR para su uso tal como se describe en el presente documento usando mutagénesis al azar de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. En alguna divulgación en el presente documento, 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 VH o VL.

30 35 40 Los dominios variables empleados tal como se describe en el presente documento pueden obtenerse o derivarse de cualquier dominio variable humano de la línea germinal o reorganizado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en las secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR para su uso tal como se describe en el presente documento (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 consenso dirigidos a, o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable junto con cebadores consenso para la tercera región de entramado de genes 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 CDR3 de la presente divulgación pueden intercambiarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos intercambiados combinados con un dominio VH o VL relacionado pueden proporcionar moléculas de anticuerpo para su uso tal como se describe en el presente documento. Después 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 de desde 10⁴ elementos individuales hacia arriba, por ejemplo al menos 10⁵, al menos 10⁶, al menos 10⁷, al menos 10⁸, al menos 10⁹ o al menos 10¹⁰ elementos.

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

50 De manera similar, pueden insertarse una o más, o las tres, CDR en un repertorio de dominios VH o VL que después se seleccionan para una molécula de anticuerpo o moléculas de anticuerpo para un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN, B-FN, el ED-A o el ED-B de fibronectina. Pueden emplearse una o más de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo F8 o L19, o el conjunto de HCDR del anticuerpo F8 o L19, y/o pueden emplearse una o más de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo F8 o L19, o el conjunto de LCDR del anticuerpo F8 o L19.

55 60 65 Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones de entramado intermedias. 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. Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que normalmente no se asocian con regiones de dominio variable que se producen de manera natural. Por ejemplo, la construcción de moléculas de anticuerpo de la presente divulgación elaboradas mediante tecnología de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N-terminales 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 proteína adicionales, incluyendo regiones constantes de anticuerpo, otros dominios

variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores detectables/funcionales tal como se comenta con más detalle en otra parte en el presente documento.

5 Aunque las moléculas de anticuerpo pueden comprender un par de dominios VH y VL, también pueden usarse dominios de unión únicos basados en cualquiera de las secuencias del dominio VH o VL tal como se describe en el presente documento. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina únicos, especialmente los dominios VH, pueden unirse a antígenos diana de manera específica. Por ejemplo, véase la discusión de dAc anterior.

10 En el caso de cualquiera de los dominios de unión únicos, estos dominios pueden usarse para seleccionar dominios complementarios que pueden formar una molécula de anticuerpo de dos dominios que pueda unirse a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos, tal como A-FN, B-FN el ED-A o el ED-B de fibronectina. Esto puede lograrse mediante métodos de selección de presentación en fagos usando el denominado enfoque combinatorio doble 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 cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican para la otra cadena (L o H), y la molécula de anticuerpo de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de presentación en fagos tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se da a conocer en Marks 1992.

15 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos completos para su uso tal como se describe en el presente documento partiendo de cualquier molécula de anticuerpo descrita en el presente documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden dominios VH y/o VL o CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, mediante métodos tales como digestión con 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 igualmente 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 los suministrados por la empresa Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

20 Un conjugado tal como se describe en el presente documento comprende IL2 y un mutante de TNF, preferiblemente TNF α , 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.

25 La IL2 es preferiblemente IL2 humana.

30 35 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 la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12. La IL2 en los conjugados de la divulgación conserva una actividad biológica de IL2 humana, por ejemplo, la capacidad de inhibir la proliferación celular.

40 45 El TNF es TNF α humano.

El mutante de TNF en los conjugados descritos en el presente documento es un mutante de TNF que conserva una función biológica de TNF humano, por ejemplo, la capacidad de inhibir la proliferación celular, pero tiene una actividad reducida.

50 55 El mutante de TNF comprende una mutación en la posición correspondiente a la posición 32 en SEQ ID NO: 15 o a la posición 52 de SEQ ID NO: 17. La R en dicha posición está sustituida por A, F o V, lo más preferiblemente A. Las secuencias de ejemplos de mutantes de TNF adecuados se exponen en SEQ ID NO: 37, 39, 54-55, 56-57, respectivamente.

60 65 En el presente documento se muestra que la identidad del residuo en la posición en un mutante de TNF correspondiente a la posición 32 en SEQ ID NO: 15 o a la posición 52 de SEQ ID NO: 17 afecta al rendimiento de la proteína sobre la expresión en un sistema recombinante. Por ejemplo, la presencia de W en esta posición conduce a una expresión sustancialmente nula en un sistema recombinante, y la presencia de A en esta posición conduce a rendimientos inesperadamente altos en un sistema recombinante.

70 75 El TNF α humano consiste en un dominio citoplásmico de 35 aminoácidos, un dominio transmembrana de 20 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 ligado de manera no covalente en disolución. En el contexto de la presente divulgación, el TNF α humano es un mutante de TNF α que es preferiblemente la forma soluble del dominio extracelular de TNF α humano, o el dominio extracelular de TNF α humano. La secuencia de la forma soluble del dominio extracelular de TNF α humano se muestra en SEQ ID NO: 15. Normalmente, el TNF α mutante tiene al menos el 70%, más preferiblemente uno de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el

98%, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 con una o más mutaciones que reducen la actividad, por ejemplo, una mutación en la posición correspondiente a la posición 32 en SEQ ID NO: 15. La secuencia del dominio extracelular de TNF α humano se muestra en SEQ ID NO: 17. En este caso, el TNF α mutante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente uno de al menos al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 con una o más mutaciones que reducen la actividad, por ejemplo, una mutación en la posición correspondiente a la posición 52 en SEQ ID NO: 17.

- 5 10 Los inventores han mostrado que un conjugado de la presente divulgación, y en particular el TNF α presente en un conjugado de la presente divulgación, en el que el residuo de arginina de TNF α en la posición 32 de SEQ ID NO: 15 o en la posición 52 de SEQ ID NO: 17 se sustituye por alanina, muestra una actividad reducida. Por tanto, el mutante de TNF α puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 o 17, excepto que el residuo en la posición 32 de SEQ ID NO: 15 o en la posición 52 de SEQ ID NO: 17 es un residuo de alanina en lugar de un residuo de arginina. Esta secuencia se muestra en SEQ ID NO: 37 o 39. Por tanto, el mutante de TNF α comprende o consiste preferiblemente en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 37. Normalmente, el mutante de TNF α 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 la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 37 con una A en la posición correspondiente a la posición 32 en SEQ ID NO: 37. Por tanto, alternativamente, el TNF α comprende o consiste preferiblemente en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39. En este caso, el TNF α 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 expuesta en SEQ ID NO: 39 con una A en la posición correspondiente a la posición 52 en SEQ ID NO: 39.
- 15 20 25 Lo más preferiblemente, la IL2 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 y/o el TNF α comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 37.

30 Los mutantes de proteínas TNF α pueden someterse a prueba mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*. Los ensayos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ensayos de actividad y ensayos de unión. La sustitución o delección del residuo de arginina en la posición 32 (Arg32) se ha descrito en la técnica anterior. Por ejemplo, se ha propuesto la sustitución del residuo de arginina por serina, glutamina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, triptófano, treonina o tirosina (documento US 7101974; documento US 5422104; documento WO1988/006625; Yamagishi *et al.*, Protein Eng. (1990) 3:713-9)). Además, en el documento EP158286 se ha propuesto la delección de Arg32. Los mutantes en los que se ha sustituido la Arg32 por triptófano han mostrado una pérdida de actividad citotóxica (Van Ostade *et al.* The Embo Journal (1991) 10:827-836). Los mutantes en los que se sustituye la arginina en la posición 29 y/o 31 y/o 32 por triptófano o tirosina muestran una diferencia significativa entre la afinidad de unión al receptor de TNF humano p75 y al receptor de TNF humano p55 (documento US 5.422.104). El documento US 7.101.974 describió variantes de TNF α que interaccionan con el TNF α de tipo natural para formar trímeros mixtos que no pueden activar la señalización de receptores. En este último ejemplo, la Arg32 se sustituye por ácido aspártico, ácido glutámico o histidina.

35 40 45 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se conecta a la IL2 y al mutante de TNF, preferiblemente al mutante de TNF α , a través de ligadores, por ejemplo, ligadores peptídicos. Alternativamente, la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o un mutante de factor de necrosis tumoral pueden conectarse directamente, por ejemplo, a través de un enlace químico. Cuando la molécula de anticuerpo se liga a IL2 y a un mutante de factor de necrosis tumoral por medio de uno o más ligadores peptídicos, el conjugado puede ser una proteína de fusión. Por "proteína de fusión" se entiende 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). En el contexto de la presente invención, el conjugado es una proteína de fusión.

50 55 60 65 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 el mutante de TNF, preferiblemente el mutante de TNF α , pueden ligarse de manera covalente, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos (enlaces amida). Por tanto, la molécula de anticuerpo, en particular una porción de scFv de una molécula de anticuerpo, y la IL2 y/o el mutante de TNF, preferiblemente el mutante de TNF α , pueden producirse como una proteína de fusión.

Cuando la molécula de anticuerpo es una molécula bicatenaria o multicatenaria (por ejemplo, un diacuerpo), la IL2 y/o el mutante de TNF pueden conjugarse como una proteína de fusión con una o más cadenas polipeptídicas en la molécula de anticuerpo.

65 El ligador peptídico que conecta la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF puede ser un ligador peptídico flexible. En la técnica se conocen ejemplos adecuados de secuencias de ligador peptídico. El ligador puede tener una longitud de 10-20 aminoácidos, preferiblemente de 10-15 aminoácidos. Lo más preferiblemente, el ligador tiene una longitud de 11-15 aminoácidos. El ligador puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13,

SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 49. En alguna divulgación preferida en el presente documento, la IL2 y el mutante de TNF pueden ligarse a la molécula de anticuerpo mediante los ligadores expuestos en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente. En otra divulgación preferida en el presente documento, la IL2 y el mutante de TNF pueden ligarse a la molécula de anticuerpo mediante los ligadores expuestos en SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 14, respectivamente.

Por ejemplo, en los conjugados ejemplificados en el ejemplo 2, la IL2 se conjugó con el dominio VH del scFv F8 y el TNF α o el mutante de TNF α se conjugó con el dominio VL del scFv F8, cada uno mediante un ligador peptídico tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 36, respectivamente. En el conjugado ejemplificado en el ejemplo 4, la IL2 se conjugó con el dominio VH del scFv L19 y el TNF α o el mutante de TNF α se conjugó con el dominio VL del scFv L19, cada uno mediante un ligador peptídico tal como se muestra en SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 44, respectivamente.

Sin embargo, se espera que el conjugado que comprende IL2 y un mutante de TNF, preferiblemente un mutante de TNF α , y una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno asociado con el crecimiento y/o la angiogénesis neoplásicos muestre las mismas propiedades de direccionamiento tumoral o similares, y/o eficacia terapéutica, ya que el factor de necrosis tumoral y la IL2 se conjugaron con la molécula de anticuerpo. Por tanto, cuando la molécula de anticuerpo es, o comprende, un scFv, la IL2 puede ligarse al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y el mutante de TNF puede ligarse 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 mutante de TNF puede ligarse al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y la IL2 puede ligarse al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico. Se espera que un conjugado tenga las mismas propiedades de direccionamiento tumoral o similares, y/o eficacia terapéutica, y/o actividad de destrucción celular, si tanto IL2 como un mutante de TNF, preferiblemente TNF α , se conjugaron con el dominio VH del anticuerpo. Por tanto, como alternativa adicional, la IL2 y el mutante de TNF, preferiblemente el mutante de TNF α , pueden ligarse al extremo C-terminal del dominio VL del anticuerpo, por ejemplo, en formato de scFv, mediante un ligador peptídico. Como otra alternativa adicional, la IL2 y el mutante de TNF, preferiblemente el mutante de TNF α , pueden ligarse al extremo N-terminal del dominio VH del anticuerpo, por ejemplo, en formato de scFv, mediante un ligador peptídico. En los dos últimos conjugados, la IL2 y el TNF pueden estar en cualquier orden y/u opcionalmente pueden estar ligados entre sí mediante un ligador peptídico. En el presente documento se describen ligadores peptídicos adecuados.

Los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 36, o pueden ser una variante de la misma. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 432 de SEQ ID NO: 36 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 36 puede comprender un residuo A en la posición 432.

Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 con una mutación R a A en la posición 432 o en SEQ ID NO: 16 con una mutación R a A en la posición 452, o pueden ser una variante de una de estas secuencias. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 16. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 432 en una variante de SEQ ID NO: 1 es A y el residuo en la posición correspondiente a la posición 452 en una variante de SEQ ID NO: 16 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 16 puede comprender un residuo A en la posición 432 o 452 respectivamente.

Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 38, o pueden ser una variante de la misma. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 452 de SEQ ID NO: 38 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 38 puede comprender un residuo A en la posición 452.

Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en una de las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 58 a 63, o pueden ser una variante de las mismas. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, una de las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 58 a 63. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 432 en una variante de SEQ ID NO:

58, 60 o 62 es W, F o V, respectivamente. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 452 en una variante de SEQ ID NO: 59, 61 o 63 es W, F o V, respectivamente.

5 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40, o pueden ser una variante de la misma. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 40. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 427 de SEQ ID NO: 40 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 40 puede comprender un residuo A en la posición 427.

10 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 41, o pueden ser una variante de la misma. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 41. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 447 de SEQ ID NO: 41 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 41 puede comprender un residuo A en la posición 447.

15 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 42, o pueden ser una variante de la misma. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 428 de SEQ ID NO: 42 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 42 puede comprender un residuo A en la posición 428.

20 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 43, o pueden ser una variante de la misma. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 448 de SEQ ID NO: 43 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 43 puede comprender un residuo A en la posición 448.

25 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 44, o pueden ser una variante de la misma. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 430 de SEQ ID NO: 44 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 44 puede comprender un residuo A en la posición 430.

30 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 45, o pueden ser una variante de la misma. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 45. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 450 de SEQ ID NO: 45 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 45 puede comprender un residuo A en la posición 450.

35 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 70 con una mutación R a A en la posición 430 o en SEQ ID NO: 71 con una mutación R a A en la posición 450, o pueden ser una variante de una de estas secuencias. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 430 en una variante de SEQ ID NO: 70 es A y el residuo en la posición correspondiente a la posición 450 en una variante de SEQ ID NO: 71 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71 puede comprender un residuo A en la posición 430 o 450, respectivamente.

40 Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 64 a 69, o pueden ser una variante de las mismas. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 64 a 69. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 430 en una variante de SEQ ID NO: 64, 66 o 68 es W, F o V, respectivamente. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 450 en una variante de SEQ ID NO: 65, 67 o 69 es W, F o V, respectivamente.

Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 47, o pueden ser una variante de la misma. Una variante puede tener al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 431 de SEQ ID NO: 47 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 47 puede comprender un residuo A en la posición 431.

Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 48, o pueden ser una variante de la misma. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48. Preferiblemente, el residuo en la posición en la variante correspondiente a la posición 451 de SEQ ID NO: 48 es A. Por ejemplo, un conjugado que es una variante de SEQ ID NO: 48 puede comprender un residuo A en la posición 451.

Alternativamente, los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender o consistir en las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 72 a 77, o pueden ser una variante de las mismas. Una variante 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% o el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 72 a 77. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 431 en una variante de SEQ ID NO: 72, 74 o 76 es W, F o V, respectivamente. Preferiblemente, el residuo en la posición correspondiente a la posición 451 en una variante de SEQ ID NO: 73, 75 o 77 es W, F o V, respectivamente.

Sin estar limitado por una explicación teórica, un conjugado descrito en el presente documento que comprende un mutante de TNF puede formar un homotímero en disolución. Un conjugado trimérico de este tipo comprendería tres moléculas de IL2 activa por una molécula de TNF activo con actividad reducida (en estructura trimérica). Esto puede ser ventajoso puesto que las inmunocitocinas basadas en IL2 se usan normalmente en la práctica clínica a dosis más altas en comparación con las inmunocitocinas basadas en TNF α . Por ejemplo, se halló que la dosis recomendada de L19-IL2 era de 4 mg en pacientes con cáncer [Johannsen *et al.* (2010) Eur. J. Cancer], mientras que la dosis recomendada de L19-TNF α está en el intervalo de dosis de 1-1,5 mg [Spitaleri *et al.* (2012) J. Clin. Oncol. Cancer Res.]. Además, pueden usarse dosis más altas de los conjugados descritos en el presente documento puesto que el mutante de TNF tiene una actividad reducida, en comparación con un conjugado que comprende un TNF de tipo natural e IL2. Por tanto, los conjugados descritos en el presente documento pueden tener propiedades ventajosas con respecto a las pautas de administración.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un conjugado tal como se describe en el presente documento. 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 engloba una molécula de ADN con la secuencia especificada, y engloba 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 proporcionan constructos en forma de plásmidos, vectores (por ejemplo, vectores de expresión), cassetes de transcripción o expresión que comprenden tales ácidos nucleicos. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que contengan 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, fagémidos, o virales, por ejemplo, fagos, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Sambrook & Russell (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3^a 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 con detalle en Ausubel *et al.* (1999) 4^a eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.

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

Los conjugados descritos en el presente documento pueden 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 de manera conveniente cultivando la célula huésped recombinante en condiciones apropiadas para la producción del conjugado. Tras la producción, el conjugado puede aislarlo y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada y después 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 los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped. 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 habitual es *E. coli*.
- La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como 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; Lerrick y Thomas (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418. Las líneas de células de mamíferos 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 de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células de riñón embrionario humano, células de retina embrionaria humana 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, virus vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. La introducción del ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota, puede usar un sistema basado en virus o plásmidos. El sistema de plásmidos puede mantenerse episómicamente o puede incorporarse en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser mediante integración o bien al azar o bien dirigida de una o más copias en un único locus o múltiples loci. Para las 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 fomentarse mediante la inclusión de secuencias que fomentan la recombinación con el genoma, según técnicas convencionales.
- El término "aislado" se refiere al estado en el que, en general, estarán los conjugados descritos en el presente documento, los anticuerpos para su uso tal como se describe en el presente documento o el ácido nucleico que codifica para tales conjugados según la presente divulgación. Por tanto, los conjugados descritos en el presente documento, los anticuerpos para su uso tal como se describe en el presente documento o el ácido nucleico que codifica para tales conjugados pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir del entorno en el que se preparan (tal como cultivo celular), en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico distinto de la secuencia que codifica para un polipéptido con la función requerida. Los elementos aislados y ácidos nucleicos aislados estarán libres o sustancialmente libres de material con el que se hallan 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 aun así aislarse para fines prácticos, por ejemplo, los elementos 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 estar no glicosilados (por ejemplo, si se producen mediante expresión en una célula procariota).
- También pueden usarse preparaciones heterogéneas de conjugados tal como se describen en el presente documento. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de conjugados que comprenden moléculas de anticuerpo con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tal como ciclización de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.
- La fibronectina es un antígeno que se somete a corte y empalme alternativo, y se conocen varias isoformas alternativas de fibronectina, incluyendo las isoformas sometidas a corte y empalme alternativo A-FN y B-FN, que comprenden dominios ED-A o ED-B, respectivamente, que son marcadores conocidos de la angiogénesis. 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 (extra dominio A). Una molécula de anticuerpo puede unirse a ED-B (extra dominio B).
- El extra dominio A (EDA o ED-A) de fibronectina también se conoce como ED, extra repetición A de tipo III (EIILA) o EDI. La secuencia de ED-A humano se ha publicado por Kornblhtt *et al.* (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868 y Paoletta *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; extra dominio 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; extra dominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P11276.

- La isoforma de ED-A de fibronectina (A-FN) contiene el extra dominio A (ED-A). La secuencia de A-FN humana puede deducirse a partir de la secuencia de precursor de fibronectina humana correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P02751. La secuencia de A-FN de ratón puede deducirse a partir de la secuencia de precursor 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 humano de fibronectina. El ED-A puede ser el extra dominio 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 prácticamente ausente en forma de FN en plasma pero es abundante durante la embriogénesis, la remodelación tisular, la fibrosis, el trasplante cardíaco y el crecimiento de tumores sólidos.
- La isoforma B-FN de fibronectina es uno de los marcadores mejor conocidos de la angiogénesis (documento US 10/382.107, documento WO01/62298). En la isoforma B-FN se halla un extra dominio "ED-B" de 91 aminoácidos y es idéntico en ratón, rata, conejo, perro y ser humano. La B-FN se acumula alrededor de las estructuras neovasculares en tumores agresivos y otros tejidos que experimentan angiogénesis, tales como el endometrio en fase proliferativa y algunas estructuras oculares en estados patológicos, pero que de otro modo es indetectable en tejidos adultos normales.
- La tenascina C es una glicoproteína hexamérica grande de la matriz extracelular que modula la adhesión celular. Está implicada en procesos tales como la proliferación celular y la migración celular, y se asocia con cambios en la arquitectura tisular que se producen durante la morfogénesis y embriogénesis, así como en la tumorigénesis o angiogénesis. Pueden generarse varias isoformas de tenascina C como resultado del corte y empalme alternativo, lo que puede conducir a la inclusión de (múltiples) dominios en la parte central de esta proteína, oscilando desde el dominio A1 al dominio D (Borsi L *et al.* *Int J Cancer* 1992; 52:688-692, Carnemolla B *et al.* *Eur J Biochem* 1992; 205:561-567, documento WO2006/050834). Una molécula de anticuerpo, tal como se hace referencia en el presente documento, puede unirse a tenascina C. Una molécula de anticuerpo puede unirse al dominio A1 de tenascina C.
- El cáncer, tal como se hace referencia en el presente documento, puede ser un cáncer que expresa, o ha mostrado 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 mostrado que expresa, la isoforma de ED-A de fibronectina, y/o la isoforma de ED-B de fibronectina. Más preferiblemente, el cáncer 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 reproductoras (tal como teratocarcinoma), cáncer de hígado, linfoma (tal como linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin), leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide 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 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 halladas en otras partes del cuerpo de un paciente.
- Los conjugados descritos en el presente documento pueden tener actividad antitumoral y, por tanto, hallar aplicación en el tratamiento del cáncer. Sin estar limitados por una explicación teórica, se espera que los conjugados muestren una potente actividad antitumoral como resultado de las excelentes propiedades de direccionamiento tumoral, tal como se demuestra en los ejemplos 3 y 4 a continuación. Por tanto, los conjugados descritos en el presente documento se diseñan para su uso en métodos de tratamiento de pacientes, preferiblemente pacientes humanos. Los conjugados de la presente divulgación pueden usarse, en particular, en el tratamiento del cáncer.
- Por consiguiente, la divulgación describe métodos de tratamiento que comprenden la administración de un conjugado descrito anteriormente, composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados y el uso de tales conjugados en la fabricación de un medicamento para 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. Se conocen bien los vehículos farmacéuticamente aceptables y el experto en la técnica los adaptará en función de la naturaleza y el modo de administración del/de los compuesto(s) activo(s)

elegido(s).

- Los conjugados descritos en el presente documento 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 5 composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento y para su uso según la presente divulgación pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser 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, intratumoral o subcutánea. 10 Preferiblemente, el conjugado de la presente divulgación se administra por vía intratumoral.
- En general, las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden un portador líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa 15 u otra disolución de sacárido, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.
- 15 Para la 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 estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica saben preparar bien disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer.
- 20 Pueden emplearse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u 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.
- 25 Una composición que comprende un conjugado descrito en el presente documento puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer, de manera concurrente o secuencial, o como una preparación combinada con otro(s) agente(s) terapéutico(s), para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, un conjugado de la divulgación puede usarse en combinación con un agente terapéutico existente contra el cáncer.
- 30 Un conjugado descrito en el presente documento puede usarse en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para administración independiente o combinada a un individuo y, por consiguiente, puede comprender el conjugado y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones independientes. Las preparaciones independientes pueden usarse para facilitar la administración independiente y secuencial o simultánea y permitir la administración de los componentes por vías diferentes.
- 35 Las composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos, preferiblemente seres humanos. La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a 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 40 velocidad y el transcurso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que esté tratándose, el paciente particular que esté tratándose, 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 administración y otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación etc., se encuentra dentro de la responsabilidad de los médicos de cabecera y otros 45 médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de una enfermedad que esté tratándose. En la técnica se conocen bien 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 dosificaciones específicas indicadas en el presente documento o en el *Physician's Desk Reference* (2003), 50 según sea apropiado para el tipo de medicamento que esté administrándose. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un conjugado para su uso tal como se describe en el presente documento 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 típica de conjugado estará en 55 el intervalo de 10 µg a 500 µg/kg para aplicaciones sistémicas. Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Esta es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés, y también ajustarse según el formato de conjugado en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanales o mensuales, según el juicio del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para 60 administración subcutánea y 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 al sitio anatómico del 65 tratamiento quirúrgico.

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica dada la presente divulgación, incluyendo los siguientes ejemplos experimentales.

5 "Y/o", cuando se usa en el presente documento, debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

10 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 igualmente a todos los aspectos y las realizaciones que se describen.

15 Ahora se ilustrarán determinados aspectos y realizaciones de la invención por medio de ejemplos y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

15 Ejemplos

20 Ejemplo 1 - Producción y análisis del conjugado hull2-F8-huTNF α , los conjugados mutantes hull2-F8-huTNF α , el conjugado hull2-L19-huTNF α y el conjugado mutante hull2-L19-huTNF α

25 Se prepararon diversos conjugados con mutantes de TNF α humano y se caracterizaron mediante FPLC, SDS-PAGE y EM. Los resultados se resumen en la tabla 1. Se observó poca o ninguna expresión del mutante R32W en cualquiera de las inmunocitocinas IL2-L19-TNF α o IL2-F8-TNF α . Los rendimientos del mutante R32A fueron inesperadamente altos para ambas inmunocitocinas.

	Proteína	Mutación	Tampón de diálisis	Rendimiento (mg/l)	Perfil de FPLC	SDS-PAGE	EM	SEQ ID NO:
1	IL2-L19-TNF α	-	PBS	1,6	✓	✓	✓	70
2	IL2-L19-TNF α	R32W	PBS	0,4	✓	✓	✓	64
3	IL2-L19-TNF α	R32A	PBS	2,2	✓	✓	✓	44
4	IL2-F8-TNF α	-	PBS	1,4	✓	✓	✓	1
5	IL2-F8-TNF α	R32W	PBS	-	X	X	X	58
6	IL2-F8-TNF α	R32A	PBS	3,4	✓	✓	✓	36
7	IL2-F8-TNF α	R32F	MES	1,9	✓	✓	✓	60
8	IL2-F8-TNF α	R32V	MES	3,2	✓	✓	✓	62

Tabla 1

30 Ejemplo 2 - Efecto del formato de conjugado sobre la actividad de destrucción celular

35 Las proteínas de fusión pudieron expresarse y purificarse hasta homogeneidad. Se analizaron el conjugado hull2-F8-huTNF α (SEQ ID NO: 1) y el conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) (SEQ ID NO: 36) purificados mediante experimentación de rutina en un sistema ÄKTA-FPLC con una columna Superdex 200 HR 10/30 y se caracterizaron mediante análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras.

40 Para someter a prueba la significación de la mutación de TNF α en el conjugado sobre la actividad de destrucción celular, se sometió a prueba la actividad de las dos proteínas de fusión en un ensayo de destrucción celular que emplea la línea celular de fibroblastos L-M. El ensayo se realizó en presencia de actinomicina D 2 μ g/ml (Sigma-Aldrich). Se sembraron las células en placas de 96 pocillos en el medio de cultivo complementado con concentraciones crecientes de hull2-F8-huTNF α (SEQ ID NO: 1) o hull2-F8-huTNF α (R32A) (SEQ ID NO: 36), tal como se indica en la figura 1. El anticuerpo F8 estaba en formato scFv en todos los conjugados sometidos a prueba. Los resultados se muestran en la figura 1. Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células tratadas únicamente con actinomicina D (usadas como control negativo). Los resultados demuestran que la actividad de destrucción celular del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) fue inferior en comparación con el conjugado hull2-F8-huTNF α , tal como puede observarse a partir de los valores de CE50 notificados en la figura 1. El valor de CE50 representa la concentración de fármaco requerida para una actividad semimáxima.

45 Ejemplo 3 - Análisis de biodistribución del conjugado mutante hull2-F8-huTNF (R32A)

El rendimiento de direccionamiento *in vivo* del conjugado mutante hull2-F8-huTNF (R32A) se evaluó mediante análisis de biodistribución. La proteína de fusión se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular y después se marcó con yodo radiactivo, ¹²⁵I. Se inyectaron un total de 12 µg (~9,6 µCi) de la preparación de proteína de fusión en la vena de la cola de ratones 129Sv immunocompetentes que portan teratocarcinomas murinos F9 5 implantados por vía subcutánea. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la inyección. Se pesaron los órganos y se contó la radiactividad con un contador gamma Packard Cobra. Se registró el contenido radiactivo de órganos representativos y se expresó como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g). Los resultados muestran una acumulación preferencial y selectiva del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) en el tumor (figura 2).

Ejemplo 4 - Producción y análisis de conjugados mutantes hull2-L19-huTNF α (R32A)

Caracterización de proteínas

La proteína de fusión hull2-L19-huTNF α (R32A) (SEQ ID NO: 44) se purificó a partir del medio de cultivo celular hasta homogeneidad mediante cromatografía de proteína A y se analizó mediante SDS-PAGE, ESI-EM y cromatografía de exclusión molecular (Superdex200 10/300GL, GE Healthcare).

La actividad biológica de TNF y IL2 se determinó en células HT-1080 y CTLL-2, respectivamente.

El conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) se comportó bien en ensayos bioquímicos, se localizó selectivamente en tumores sólidos *in vivo* y presentó una idéntica actividad *in vitro* de los restos IL2 y TNF, usando ensayos celulares basados en la proliferación de linfocitos CTLL-2 murinos (figura 3) y en la destrucción de la línea de células tumorales HT-1080 humanas (figura 4).

Estudios de biodistribución

El rendimiento de direccionamiento de EDB *in vivo* del conjugado mutante hull2-L19-huTNF (R32A) se evaluó mediante análisis de biodistribución. Se inyectaron 10 µg de proteína de fusión marcada con yodo radiactivo en la vena lateral de la cola de ratones que portan tumores F9. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la inyección, se extrajeron los órganos, se pesaron y se midió la radiactividad de órganos y tumores usando un contador γ Cobra y se expresó como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g \pm EEM), (n = 3 ratones por grupo). Los resultados muestran una acumulación preferencial y selectiva del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) en el tumor (figura 5).

Lista de secuencias

1. Secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-F8-huTNF α [forma soluble] (SEQ ID NO: 1)

La secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-F8-huTNF α [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - TNF α humano [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas. El TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLLQLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLHTHTISRIASYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
```

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

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRTI
```

3. Secuencia de aminoácidos del ligador que liga el dominio VH al dominio VL del anticuerpo (SEQ ID NO: 3)

```
GGGGSGGGGGGGGG
```

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

```
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS
```

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLF DYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGGEEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS VSMPLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQM RGRPPTFGQGT KVEIK

6. Secuencias de aminoácidos de las CDR de F8

- 5 VH de CDR1 de F8 - LFT (SEQ ID NO: 6)
 VH de CDR2 de F8 - SGSGGS (SEQ ID NO: 7)
 10 VH de CDR3 de F8 - STHLYL (SEQ ID NO: 8)
 VL de CDR1 de F8 - M F (SEQ ID NO: 9)
 VL de CDR2 de F8 - GASSRAT (SEQ ID NO: 10)
 15 VL de CDR3 de F8 - MRGRPP (SEQ ID NO: 11)

7. Secuencia de aminoácidos de IL2 humana (hIL2) en los conjugados (SEQ ID NO: 12)

20 APTSSSTKKTQLQLEHLLL DLOMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRP RD LI SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

8. Secuencia de aminoácidos del ligador que liga la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF (SEQ ID NO: 13)

25 GDGSSGGSGGAS

9. Secuencia de aminoácidos del ligador que liga la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF (SEQ ID NO: 14)

30 SSSSGSSSSGSSSSG

10. Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular de TNF α humano (huTNF α) (SEQ ID NO: 15)

35 VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRNALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIA VS YOTKVNLLSAIKSPCORETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFOLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGOVYFGII AL

11. Secuencia de aminoácidos del conjugado hIL2-F8-huTNF α [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 16)

40 La secuencia de aminoácidos del conjugado hIL2-F8-huTNF α [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - TNF α humano [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas. El TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSSTKKTQLQLEHLLL DLOMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRP RD LI SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVOLLESGGGLVOPGGSLRLSCAASGF TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLF DYWGQGT I VTVSSGGGGGGGGGGEEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS VSMPLAWYQQKPGOAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOMRGRPPTFGOGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGPOREFPRDLSLISPLAOAVRSSSRTPSD KPVAHVVANPOAEGQLQWLNRNALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIA VS YOTKVNLLSAIKSPCORETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFOLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGOVYFGII AL

45 12. Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de TNF α humano (huTNF α) (SEQ ID NO: 17)

GPOREFPRDLSLISPLAOAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPOAEGQLQWLNRNALLANGVELRDNOLVVPSEGLYLIYSQVLFKG OGC P STHVLLTHTISRIA VS YOTKVNLLSAIKSPCORETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFOLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGOVYFG II AL

13. Secuencia de aminoácidos de las CDR de L19

50 VH de CDR1 de L19 - Ser Phe Ser Met Ser (SEQ ID NO: 18)

VH de CDR2 de L19 - Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 19)

ES 2 893 249 T3

VH de CDR3 de L19 - Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 20)

VL de CDR1 de L19 - Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala (SEQ ID NO: 21)

5

VL de CDR2 de L19 - Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr (SEQ ID NO: 22)

VL de CDR3 de L19 - Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 23)

10 14. Secuencia de aminoácidos del dominio VH de L19 (SEQ ID NO: 24)

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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

15 15. Secuencia de aminoácidos del dominio VL de L19 (SEQ ID NO: 25)

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

16. Secuencia de aminoácidos de scFv(L19) (SEQ ID NO: 26)

20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 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

17. Secuencia de aminoácidos de las CDR de F16

25 VH de CDR1 de F16 - RYGMS (SEQ ID NO: 27)

VH de CDR2 de F16 - AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 28)

30

VH de CDR3 de F16 - AHNAFDY (SEQ ID NO: 29)

VL de CDR1 de F16 - QGDSSLRSYYAS (SEQ ID NO: 30)

VL de CDR2 de F16 - GKNRPS (SEQ ID NO: 31)

VL de CDR3 de F16 - NSSVYTMPPVV (SEQ ID NO: 32)

5 18. Secuencia de aminoácidos del dominio VH de F16 (SEQ ID NO: 33)

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGTFSRGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN
RAEDTAVYYCAKAHNAFDYWQGTLTVSR

10 19. Secuencia de aminoácidos del dominio VL de F16 (SEQ ID NO: 34)

SSELTQDPAVSVALGQTVRTCQGDSLRSSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDADYY
CNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLG

15 20. Secuencia de aminoácidos del scFv(F16) (SEQ ID NO: 35)

15 La secuencia del ligador de los dominios VH y VL se muestra subrayada.

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGTFSRGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN
RAEDTAVYYCAKAHNAFDYWQGTLTVSRGGGGGGSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRTCQGDSLRSSYYASWYQQKPGQAPV
IYGKNNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLG

20 21. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) [forma soluble] (SEQ ID NO: 36)

20 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32A) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R32A) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano (R32A) en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

25 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD
LISNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGGASEVQLLESGGGLVQPGGLRLSCAASGF
TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
VTVSSGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMGRPPTFGQGKTVEIKSSSSGSSSSGSSSGVRSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWL
NRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTHSRIAVSYQTKVNL
LSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

30 22. Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R32A) (huTNF α R32A) (SEQ ID NO: 37). R32A está subrayado en negrita.

VRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTHSRIAV
SYQTKVNL
LSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

35 23. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52A) (huTNF α R52A) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 38)

35 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R52A) [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano (R52A) en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD
LISNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGGASEVQLLESGGGLVQPGGLRLSCAASGF
TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
VTVSSGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMGRPPTFGQGKTVEIKSSSSGSSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSD
KPVAVHVANPQAEGQLQWLNRRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTHSRIAVSYQTKVNL
SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

45 24. Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R52A) (huTNF α R52A) [dominio extracelular](SEQ ID NO: 39). R52A está subrayado en negrita.

GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFK
GQGCPSTHVLLHTHSRIAVSYQTKVNL
LSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

25. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32A) [forma soluble] (SEQ ID NO: 40)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32A) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador – mutante de TNF α humano (R32A) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNADFYWQGQTLVT
VSRRGGSGGGSGGSSELTQDPAVVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFGSSSGNTASLT
ITGAQAEDAEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAHHVANPQAEGQLQWLNRAANA
LLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG
GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
```

26. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 41)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador – mutante de TNF α humano (R52A)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNADFYWQGQTLVT
VSRRGGSGGGSGGSSELTQDPAVVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFGSSSGNTASLT
ITGAQAEDAEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGPPQREFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAH
VVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPC
QRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
```

27. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) [forma soluble] (SEQ ID NO: 42)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R32A) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGSGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFPYFDYWQGQTLVT
VSS
GDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGQTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHHVANPQAEGQLQWLNRAANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGV
FQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
```

28. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 43)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R52A)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGSGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFPYFDYWQGQTLVT
VSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGQTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGPPQREFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVA
HVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP
CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
```

29. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) [forma soluble] (SEQ ID NO: 44)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32A) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R32A) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

5 APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLRPRDLISNIINVIVLELKGETTFCMEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGTTYYADSVKGRTISRDNSKNTLYLQMSNLSRAEDTAVYYCAKPFYFYDYGQGTLTVTSSGDGSSGGSGASEIVLQSPGTILSLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQOKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFGSGSGSDTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSGSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNR~~A~~ANALLANGVELRDNQILVVPSEGLYLISQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRRLSAEINRPDYLDFAESGOVYFGIIAL

30. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-L19-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 45)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-L19-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R52A)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

15
APTSSTKKTQIQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLRPRDLS
SNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII~~STLT~~GGGGSGGGSGGGEVQ~~L~~ESGGGLVQP~~G~~SLRLSCAAS
GFTSSFSMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGTTYYADSVKGRTI~~S~~RDN~~S~~KNTLYLQMN~~S~~LAEDTAVYYCAKPF~~P~~YFDYWQG~~T~~
VT~~V~~S~~S~~GDGSGGS~~G~~ASE~~I~~VL~~T~~QSP~~G~~TL~~S~~LP~~G~~ERAT~~L~~SCRAS~~Q~~S~~V~~SS~~F~~IAWYQ~~Q~~KPGQ~~A~~PR~~L~~LIYYASSRATGIPDRFSGSG
TD~~F~~TL~~T~~ISR~~L~~EPE~~D~~FAVYYCQQTGR~~I~~PP~~T~~FGQ~~G~~TK~~V~~EIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEF~~P~~R~~D~~LSL~~I~~SPLAQ~~A~~VR~~S~~SSR~~T~~PSDKP
VAHV~~V~~ANPQAEGQLQ~~W~~LN~~R~~ANALLANGVELRDNQ~~L~~V~~V~~SE~~G~~LYLIYSQ~~V~~LFKGQ~~G~~C~~P~~STH~~V~~LLHTISRIA~~V~~SYQT~~K~~V~~N~~LLSAIK
SPCORET~~P~~EGA~~E~~AKP~~W~~YEE~~I~~YLG~~G~~VFOLEKG~~D~~RL~~S~~AE~~I~~NR~~P~~DYLD~~F~~A~~E~~SGOVY~~F~~GI~~I~~AL

31. Secuencia de aminoácidos del scFv(F16) (SEQ ID NO: 46)

20 La secuencia del ligador de los dominios VH y VL se muestra subrayada.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRGMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWQGQTLTVSRGGGGSGGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKP GQAPVLVYKGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSVYTMPVVFGGGTKLTVLG

32. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32A) [forma soluble] (SEQ ID NO: 47)

25 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNF α (**R32A**) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R32A) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

30 APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGSETTFMCYEADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGREFTISRDNSKNLTYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNADFYWQGTLVT
VSRGGGGSGGGSGGGSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT
ASLTITGAQAEEADEYYCNSSVYTMPPVFFGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
AANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP
IYLGGVFQOLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGOVYFGIIAL

33. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52A) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 48)

35 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNF α (**R52A**) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R52A)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52A está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjuagado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKAHNADFYGQGLVTVSRRGGGGSGGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGGPQREEFPRLSLSIPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

34. Secuencia de aminoácidos del ligador que liga la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF (SEQ ID NO: 49)

5 GGGGSGGGGGGGGG

35. Secuencia de aminoácidos del ligador que liga el dominio VH al dominio VL del anticuerpo (SEQ ID NO: 50)

10 GDGSSGGSGGAS

36. Secuencia de aminoácidos del ligador que liga el dominio VH al dominio VL del anticuerpo (SEQ ID NO: 51)

15 GGGSGGGSGG

37. Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R32W) (huTNF α R32W) (SEQ ID NO: 52). R32W está subrayado en negrita.

VRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

38. Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R52W) (huTNF α R52W) (SEQ ID NO: 53). R52W está subrayado en negrita.

GPQREEFPRLSLSIPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

39. Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R32F) (huTNF α R32F) (SEQ ID NO: 54). R32F está subrayado en negrita.

VRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

40. Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R52F) (huTNF α R52F) (SEQ ID NO: 55). R52F está subrayado en negrita.

GPQREEFPRLSLSIPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

41. Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R32V) (huTNF α R32V) (SEQ ID NO: 56). R32V está subrayado en negrita.

VRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

42. Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNF α humano (R52V) (huTNF α R52V) (SEQ ID NO: 57). R52V está subrayado en negrita.

GPQREEFPRLSLSIPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIAQSQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

43. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32W) [forma soluble] (SEQ ID NO: 58)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32W) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R32W) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32W está subrayado en negrita. El mutante de

TNF α humano (R32W) en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
VTVSSGGGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRAFTGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
WANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI
```

5 44. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52W) (huTNF α R52W) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 59)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52W) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R52W) [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52W está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano (R52W) en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
VTVSSGGGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRAFTGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
WANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI
```

15 45. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32F) [forma soluble] (SEQ ID NO: 60)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32F) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R32F) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32F está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano (R32F) en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
VTVSSGGGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRAFTGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
FANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI
```

25 46. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52F) (huTNF α R52F) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 61)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52F) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R52F) [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52F está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano (R52F) en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

```
APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
VTVSSGGGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRAFTGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
FANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI
```

35 47. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32V) [forma soluble] (SEQ ID NO: 62)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R32V) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano (R32V) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32V está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano (R32V) en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
 TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
 VTVSSGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG
 SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOMRGRPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLN
RVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA
VSYQTKVNL
 SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
 PIYLGGVFQLEKGDR
 LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

48. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α (R52V) (huTNF α R52V) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 63)

- 5 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNF α **(R52V)** [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F8 - ligador - VL de F8 - ligador - mutante de TNF α humano **(R52V)** [dominio extracelular]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52V está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano **(R52V)** en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

10 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
 TFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTL
 VTVSSGGGGGGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG
 SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOMRGRPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGQPQREEFP
 RDLISLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLN
RVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA
VSYQTKVNL
 SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR
 LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

49. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32W) [forma soluble] (SEQ ID NO: 64)

- 15 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α **(R32W)** [forma soluble] conjugado (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R32W) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32W está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

19 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
 PYFDYWGQGTL
 VTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIY
 YASSRATGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGSSSSGQPQREEFP
 RDLISLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLN
RANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA
VSYQTKVNL
 SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR
 LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

50. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52W) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 65)

- 25 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α **(R52W)** [dominio extracelular] conjugado (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano **(R52W)**) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52W está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

29 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF
 PYFDYWGQGTL
 VTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIY
 YASSRATGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGSSSSGQPQREEFP
 RDLISLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLN
RANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA
VSYQTKVNL
 SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR
 LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

51. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32F) [forma soluble] (SEQ ID NO: 66)

- 35 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α **(R32F)** [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R32F) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32F está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTL
 VTVSSGDSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKP
 VAHVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTHTISRIAVSYQTKVNL
 LSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

52. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52F) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 67)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52F) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R52F)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52F está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTL
 VTVSSGDSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKP
 VAHVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTHTISR
 IA VSYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

53. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32V) [forma soluble] (SEQ ID NO: 68)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R32V) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R32V) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32V está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTL
 VTVSSGDSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKP
 VAHVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTHTISR
 IA VSYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

54. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52V) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 69)

La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNF α (R52V) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador – mutante de TNF α humano (R52V)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52V está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTL
 VTVSSGDSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSG
 TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKP
 VAHVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTHTISR
 IA VSYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

55. Secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-L19-huTNF α [forma soluble] (SEQ ID NO: 70)

La secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-L19-huTNF α [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador - TNF α humano [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas. El TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGSGGGSGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF^{PY}F^{DY}WGQGT^L
 VTVSSGDSSGGSGGASEI^VLTQSPGTLLSLSPGERATLSCRASQS^VSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPD^RFSGGSG
 TDFTLTISRL^EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
 ANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVL^LTHTISRIA^VSYQTKVNL^LSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 YLGGVFQLEKGDR^LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

56. Secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-L19-huTNF α [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 71)

- 5 La secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-L19-huTNF α [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de L19 - ligador - VL de L19 - ligador - TNF α humano) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas. El TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGGGGSGGGSGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPF^{PY}F^{DY}WGQGT^L
 VTVSSGDSSGGSGGASEI^VLTQSPGTLLSLSPGERATLSCRASQS^VSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPD^RFSGGSG
 TDFTLTISRL^EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKP
 VAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVL^LTHTISRIA^VSYQTKVNL^LSAIK
 SPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR^LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

10 57. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32W) [forma soluble] (SEQ ID NO: 72)

- 15 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32W) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R32W) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32W está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
 TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHN^AF^{DY}WGQGT^LVT
 VSRRGGGGSGGGSGGGGS^{SE}LTDPAVSVALQTVR^ITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV^LVIY^GKNNRPSGIPD^RFSGSSGNT
 ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVV^FGGGT^KLTVL^GSSSSGSSSSGSSSSG^GGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDK
 PVAHVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVL^LTHTISRIA^VSYQTKVNL^LSAIK
 SPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR^LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

20 58. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52W) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 73)

- 25 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52W) [dominio extracelular] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R52W)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52W está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
 TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHN^AF^{DY}WGQGT^LVT
 VSRRGGGGSGGGSGGGGS^{SE}LTDPAVSVALQTVR^ITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV^LVIY^GKNNRPSGIPD^RFSGSSGNT
 ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVV^FGGGT^KLTVL^GSSSSGSSSSGSSSSG^GGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDK
 PVAHVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVL^LTHTISRIA^VSYQTKVNL^LSAIK
 KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR^LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

30 59. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32F) [forma soluble] (SEQ ID NO: 74)

- 35 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32F) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R32F) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32F está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
 SNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
 TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHN^AF^{DY}WGQGT^LVT
 VSRRGGGGSGGGSGGGGS^{SE}LTDPAVSVALQTVR^ITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV^LVIY^GKNNRPSGIPD^RFSGSSGNT
 ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVV^FGGGT^KLTVL^GSSSSGSSSSGSSSSG^GGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDK
 PVAHVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVL^LTHTISRIA^VSYQTKVNL^LSAIK
 SPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR^LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

60. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52F) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 75)

5 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (**R52F**) [dominio extracelular] conjugado (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R52F)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52F está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNADFYGQGTLVT
VSRRGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSSGNT
ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDK
PVAHVANPQAEGQLQWLNR**FANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIA**VSYQTKVNL
10 SAI KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

61. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R32V) [forma soluble] (SEQ ID NO: 76)

15 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (**R32V**) [forma soluble] (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador – mutante de TNF α humano (R32V) [forma soluble]) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R32V está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es la forma soluble del dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNADFYGQGTLVT
VSRRGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSSGNT
ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSGVRSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
10 **VANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIA**VSYQTKVNL
SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

62. Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (R52V) [dominio extracelular] (SEQ ID NO: 77)

25 La secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNF α (**R52V**) [dominio extracelular] conjugado (IL2 humana - ligador - VH de F16 - ligador - VL de F16 - ligador - mutante de TNF α humano (R52V)) se muestra a continuación. Las secuencias de ligador están subrayadas y el R52V está subrayado en negrita. El mutante de TNF α humano en este conjugado es el dominio extracelular de TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNADFYGQGTLVT
VSRRGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSSGNT
ASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSGVRSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNR
10 **VANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLTTISRIA**VSYQTKVNL
SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

30 **Lista de secuencias**

- <110> PHILOGEN S.P.A.
- 35 <120> Inmunoconjungados de IL2 y mutante de TNF
- <130> NRS/FP7322332
- 40 <150> Documento GB1618888.0
<151> 09-11-2016
- <150> Documento GB1712916.4
<151> 11-08-2017
- 45 <160> 77
- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 893 249 T3

<210> 1
<211> 557
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-F8-huTNFalfa [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
10

ES 2 893 249 T3

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 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 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 Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Ser 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 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

ES 2 893 249 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del dominio VH de F8

10

<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

ES 2 893 249 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del ligador que liga el dominio VH al dominio VL del anticuerpo

10

<400> 3

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

<210> 4

15 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia 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

ES 2 893 249 T3

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

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

10 <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 Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

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 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

15 <210> 6

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> VH de CDR1 de F8

 <400> 6
 Leu Phe Thr
 1
 10 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> VH de CDR2 de F8

 <400> 7
 Ser Gly Ser Gly Gly Ser
 20 1 5

 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH de CDR3 de F8

 30 <400> 8
 Ser Thr His Leu Tyr Leu
 1 5

 <210> 9
 <211> 3
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VL de CDR1 de F8
 40 <400> 9
 Met Pro Phe
 1

 <210> 10
 45 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> VL de CDR2 de F8

 <400> 10
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 55 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> VL de CDR3 de F8

<400> 11
 Met Arg Gly Arg Pro Pro
 1 5

5 <210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de IL2 humana (hIL2) en los conjugados

<400> 12
 Ala Pro Thr 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

15 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

20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del ligador que liga la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF

25 <400> 13
 Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 1 5 10

30 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Secuencia de aminoácidos del ligador que liga la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF

ES 2 893 249 T3

<400> 14
Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
1 5 10 15

5 <210> 15
<211> 157
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular de TNF alfa humano (huTNFalfa)

<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

15 <210> 16
<211> 577
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado huL2-F8-huTNFalfa [dominio extracelular]

<400> 16
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

ES 2 893 249 T3

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 Ile 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 Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly
260 265 270

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

ES 2 893 249 T3

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

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

ES 2 893 249 T3

<210> 17
<211> 177
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de TNFalfa humano (huTNFalfa)

<400> 17
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

10 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
15 <210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> VH de CDR1 de L19

<400> 18
Ser Phe Ser Met Ser
1 5

25 <210> 19
<211> 17
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> VH de CDR2 de L19

<400> 19
Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

10 <210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> VH de CDR3 de L19

<400> 20
Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5

20 <210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> VL de CDR1 de L19

<400> 21
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
30 1 5 10

35 <210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> VL de CDR2 de L19

<400> 22
Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

45 <210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> VL de CDR3 de L19

<400> 23
Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5

55 <210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos del dominio VH de L19

ES 2 893 249 T3

<400> 24

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

5

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del dominio VL de L19

<400> 25

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

15

<210> 26

<211> 236

ES 2 893 249 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de scFv(L19)

<400> 26
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 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

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

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH de CDR1 de F16

5 <400> 27
Arg Tyr Gly Met Ser
 1 5

10 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> VH de CDR2 de F16

15 <400> 28
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

30 Gly

20 <210> 29
 <211> 7
 20 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> VH de CDR3 de F16

25 <400> 29
Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr
 1 5

30 <210> 30
 30 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> VL de CDR1 de F16

35 <400> 30
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10

40 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> VL de CDR2 de F16

45 <400> 31
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 50 1 5

55 <210> 32
 <211> 11
 55 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> VL de CDR3 de F16

ES 2 893 249 T3

<400> 32
Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
1 5 10

5 <210> 33
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del dominio VH de F16

<400> 33
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

15 <210> 34
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del dominio VL de F16

<400> 34

ES 2 893 249 T3

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 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 35

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del scFv(F16)

10

<400> 35

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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

ES 2 893 249 T3

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 Ser Gly Gly Ser 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 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230 235

<210> 36

<211> 557

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F8-huTNFalfa (R32A) [forma soluble]

10

<400> 36

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

ES 2 893 249 T3

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 Ser Gly Gly Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Ser 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

ES 2 893 249 T3

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 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 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 Ala
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> 37

5 <211> 157

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R32A) (huTNFalfa R32A)

ES 2 893 249 T3

<400> 37

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 Ala
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> 38

5 <211> 577

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNFalfa (R52A) (huTNFalfa R52A) [dominio extracelular]

<400> 38

ES 2 893 249 T3

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 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

ES 2 893 249 T3

245

250

255

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

Ser 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 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 Ala 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

ES 2 893 249 T3

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> 39

<211> 177

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R52A) (huTNFalfa
10 R52A) [dominio extracelular]

<400> 39

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 Ala 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

ES 2 893 249 T3

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> 40

<211> 552

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNFalfa (R32A) [forma soluble]

10

<400> 40

Ala Pro Thr 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 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

ES 2 893 249 T3

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 Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

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

Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Ieu Glu Trp
180 185 190

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
260 265 270

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
275 280 285

Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
290 295 300

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
305 310 315 320

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
325 330 335

Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
340 345 350

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val
355 360 365

Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser
370 375 380

ES 2 893 249 T3

Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val Arg Ser Ser Ser
385 390 395 400

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

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

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

Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys
450 455 460

Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val
465 470 475 480

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

Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro
500 505 510

Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser
515 520 525

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

Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
545 550

<210> 41

<211> 572

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNFalfa (R52A) [dominio extracelular]

10

<400> 41

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

ES 2 893 249 T3

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 Ile 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 Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Arg
165 170 175

Tyr Gly 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 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
260 265 270

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
275 280 285

ES 2 893 249 T3

Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
290 295 300

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
305 310 315 320

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
325 330 335

Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
340 345 350

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val
355 360 365

Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser
370 375 380

Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Pro Gln Arg Glu
385 390 395 400

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

Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
420 425 430

Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala Ala
435 440 445

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

Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys
465 470 475 480

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

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

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

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

<210> 42

ES 2 893 249 T3

<211> 553
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-L19-huTNFalfa (R32A) [forma soluble]

<400> 42
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 Ser

ES 2 893 249 T3

165

170

175

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

Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr 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 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
260 265 270

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

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

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
305 310 315 320

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

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

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile
355 360 365

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

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val Arg Ser Ser
385 390 395 400

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
465 470 475 480

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

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
500 505 510

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

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

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
545 550

<210> 43

<211> 573

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del mutante hull2-L19-huTNFalfa (R52A) [dominio extracelular]

10

<400> 43

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

ES 2 893 249 T3

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 Ala
130 135 140

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

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

Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr 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 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala
260 265 270

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

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

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
305 310 315 320

ES 2 893 249 T3

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

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

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile
355 360 365

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

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Pro Gln Arg
385 390 395 400

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

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
545 550 555 560

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

<210> 44

<211> 555

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-L19-huTNFalfa (R32A) [forma soluble]

10 <400> 44

ES 2 893 249 T3

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

ES 2 893 249 T3

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val Arg
385 390 395 400

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

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

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

Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly

ES 2 893 249 T3

450

455

460

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

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

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

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

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

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

<210> 45

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huLL2-L19-huTNFalfa (R52A) [dominio extracelular]

10

<400> 45

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 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

ES 2 893 249 T3

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del scFv(F16)

10 <400> 46

ES 2 893 249 T3

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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47

<211> 556

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F16-huTNFalfa (R32A) [forma soluble]

10 <400> 47

ES 2 893 249 T3

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 Arg
165 170 175

Tyr Gly 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

ES 2 893 249 T3

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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
355 360 365

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val
385 390 395 400

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 48

<211> 576

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNFalfa (R52A) [dominio extracelular]

10

<400> 48

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 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

ES 2 893 249 T3

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 Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

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

Tyr Gly 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 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
355 360 365

ES 2 893 249 T3

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del ligador que liga la molécula de anticuerpo y la IL2 y/o el mutante de TNF

10

<400> 49

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

<210> 50

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del ligador que liga el dominio VH al dominio VL del anticuerpo

<400> 50
 Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 1 5 10

5 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del ligador que liga el dominio VH al dominio VL del anticuerpo

<400> 51
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10

15 <210> 52
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R32W) (huTNFalfa R32W)

25 <400> 52
 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 Trp
 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

30 <210> 53
 <211> 177
 <212> PRT

ES 2 893 249 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R52W) (huTNFalfa
5 R52W)

<400> 53

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 Trp 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

10 Leu

<210> 54

<211> 157

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano
(R32F) (huTNFalfa R32F)

20 <400> 54

ES 2 893 249 T3

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 Phe
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

- 5 <210> 55
<211> 177
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R52F) (huTNFalfa R52F)
<400> 55

ES 2 893 249 T3

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 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 Phe 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

- 5 <210> 56
<211> 157
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R32V) (huTNFalfa R32V)
- <400> 56

ES 2 893 249 T3

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 Val
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> 57

<211> 177

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del mutante de TNFalfa humano (R52V) (huTNFalfa
10 R52V)

<400> 57

ES 2 893 249 T3

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 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 Val 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> 58

<211> 557

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F8-huTNFalfa (R32W) [forma soluble]

10 <400> 58

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

ES 2 893 249 T3

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 Ala
 130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 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

ES 2 893 249 T3

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

Ser 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 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 Trp
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

ES 2 893 249 T3

<210> 59
<211> 577
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F8-huTNFalfa (R52W) (huTNFalfa R52W) [dominio extracelular]
10 <400> 59
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 Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

ES 2 893 249 T3

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 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 Ser Gly Gly Gly Gly
260 265 270

Ser 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

ES 2 893 249 T3

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 Trp 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> 60

<211> 557

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F8-huTNFalfa (R32F) [forma soluble]

10

<400> 60

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

ES 2 893 249 T3

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 Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly Gly
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu

ES 2 893 249 T3

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	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	Phe
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						

ES 2 893 249 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F8-huTNFalfa (R52F) (huTNFalfa R52F) [dominio extracelular]

<400> 61
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 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

ES 2 893 249 T3

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 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 Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Ser 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

ES 2 893 249 T3

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

Leu Asn Arg Phe 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> 62

<211> 557

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F8-huTNFalfa (R32V) [forma soluble]

10

<400> 62

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

ES 2 893 249 T3

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 Ser Gly Gly Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Ser 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

ES 2 893 249 T3

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 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 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 Val
 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

- 5 <210> 63
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F8-huTNalpha (R52V) (huTNFalpha R52V) [dominio extracelular]

ES 2 893 249 T3

<400> 63
 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 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

ES 2 893 249 T3

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
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 Ser Gly Gly Gly Gly		
260	265	270
Ser 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
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 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 Gly Ser Ser Ser Ser Gly		
385	390	395
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

ES 2 893 249 T3

Leu Asn Arg Val 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> 64

<211> 555

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-L19-huTNFalfa (R32W) [forma soluble]

10

<400> 64

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 Leu Lys
50 55 60

ES 2 893 249 T3

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 Gly Ser Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 65

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-L19-huTNFalfa (R52W) [dominio extracelular]

10 <400> 65

ES 2 893 249 T3

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

ES 2 893 249 T3

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Pro
385 390 395 400

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

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

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

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

Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val

ES 2 893 249 T3

465

470

475

480

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

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

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

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

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

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

<210> 66

<211> 555

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-L19-huTNFalfa (R32F) [forma soluble]

10

<400> 66

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 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

ES 2 893 249 T3

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
 195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 67

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-L19-huTNFalfa (R52F) [dominio extracelular]

10 <400> 67

ES 2 893 249 T3

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Pro
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

<210> 68

<211> 555

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-L19-huTNFalfa (R32V) [forma soluble]

10

<400> 68

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 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

ES 2 893 249 T3

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val Arg

ES 2 893 249 T3

385

390

395

400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69

<211> 575

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-L19-huTNFalfa (R52V) [dominio extracelular]

10 <400> 69

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

ES 2 893 249 T3

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
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 Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln		
145	150	155
160		
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
165	170	175
Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
180	185	190
Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala		
195	200	205
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
210	215	220
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
225	230	235
240		
Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
245	250	255
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly		
260	265	270
Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu		
275	280	285

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
 355 360 365

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

 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 565 570 575 580

5 <210> 70
<211> 555

ES 2 893 249 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado hull2-L19-huTNFalfa [forma soluble]

<400> 70
Ala Pro Thr 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 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

ES 2 893 249 T3

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val Arg
385 390 395 400

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 71

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado huL2-L19-huTNFalfa [dominio extracelular]

10

<400> 71

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 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

ES 2 893 249 T3

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 Gly Ser Gly Gly Ser Gly
130 135 140

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

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
195 200 205

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

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

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

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp

ES 2 893 249 T3

325

330

335

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
355 360 365

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

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 72

<211> 556

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F16-huTNFalfa (R32W) [forma soluble]

10 <400> 72

ES 2 893 249 T3

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 Arg
165 170 175

Tyr Gly 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

ES 2 893 249 T3

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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
355 360 365

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val
385 390 395 400

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 73

<211> 576

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNFalfa (R52W) [dominio extracelular]

10

<400> 73

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 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

ES 2 893 249 T3

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 Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

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

Tyr Gly 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 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
355 360 365

ES 2 893 249 T3

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 74

<211> 556

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F16-huTNFalfa (R32F) [forma soluble]

10 <400> 74

ES 2 893 249 T3

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 Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Arg
165 170 175

Tyr Gly 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 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

ES 2 893 249 T3

245

250

255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
 355 360 365

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 370 375 380

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

<210> 75

<211> 576

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante hull2-F16-huTNFalfa (R52F) [dominio extracelular]

10

<400> 75

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 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

ES 2 893 249 T3

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Arg
165 170 175

Tyr Gly 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 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
355 360 365

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 76

<211> 556

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huIL2-F16-huTNFalfa (R32V) [forma soluble]

10

<400> 76

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

ES 2 893 249 T3

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 Ile 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 Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Arg
165 170 175

Tyr Gly 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 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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
275 280 285

ES 2 893 249 T3

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
355 360 365

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 77
5 <211> 576
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 893 249 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del conjugado mutante huL2-F16-huTNFalfa (R52V) [dominio extracelular]

5 <400> 77

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 Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Arg
165 170 175

Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

ES 2 893 249 T3

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 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 245 250 255

Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270

Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 275 280 285

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 290 295 300

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 325 330 335

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 340 345 350

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr
 355 360 365

Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 370 375 380

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

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

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

ES 2 893 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende interleucina-2 (IL2), un mutante de factor de necrosis tumoral (TNF α) humano y una molécula de anticuerpo que se une a fibronectina,
- 5 en la que el mutante de TNF α humano tiene actividad reducida en relación con el TNF α humano de tipo natural y comprende la secuencia de aminoácidos de TNF α de tipo natural, estando la R en una posición correspondiente a R32 de SEQ ID NO: 15 o R52 de SEQ ID NO: 17 sustituida por A, F o V; y
- 10 en la que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv) o un diacuerpo.
2. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el mutante de TNF α humano tiene una mutación R a A en dicha posición.
- 15 3. La proteína de fusión según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el TNF α humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39.
4. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la molécula de anticuerpo se une al extra dominio A (ED-A) de fibronectina.
- 20 5. La proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que
- (i) la molécula de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que tiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 expuestas en las SEQ ID NO: 6-11;
- 25 (ii) la molécula de anticuerpo comprende los dominios VH y VL del anticuerpo F8 expuestos en las SEQ ID NO: 2 y 4; y/o
- (iii) la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de scFv F8 expuesta en SEQ ID NO: 5.
- 30 6. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la molécula de anticuerpo se une al extra dominio B (ED-B) de fibronectina.
- 35 7. La proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que
- (i) la molécula de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que tiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo L19 expuestas en las SEQ ID NO: 18-23,
- 40 (ii) la molécula de anticuerpo comprende los dominios VH y VL del anticuerpo L19 expuestos en las SEQ ID NO: 24 y 25 y/o
- (iii) la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de scFv L19 expuesta en SEQ ID NO: 26.
- 45 8. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv) y en la que;
- 50 (i) la IL2 está ligada al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y el mutante de TNF está ligado al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico,
- (ii) el mutante de TNF está ligado al extremo N-terminal del dominio VH del scFv mediante un ligador peptídico y la IL2 está ligada al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico, o
- 55 (iii) la IL2 y el mutante de TNF están ligados al extremo C-terminal del dominio VL del scFv mediante un ligador peptídico o la IL2 y el TNF α están ligados al extremo N-terminal del scFv mediante un ligador peptídico.
- 60 9. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que
- (i) la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una mutación R a A en la posición 432 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 con una mutación R a A en la posición 452; o
- (ii) la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38.

10. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y de las reivindicaciones 6 a 7, en la que;
 - 5 (i) la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 con una mutación R a A en la posición 430 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 con una mutación R a A en la posición 450, o
 - 10 (ii) la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 45.
11. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico, o una célula huésped que comprende dicho vector.
- 15 12. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante el direccionamiento de IL2 y TNF a la neovasculatura *in vivo*.
- 20 13. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 12, en la que el cáncer es un melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón o un sarcoma, o el tumor es el resultado de un melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón o un sarcoma.

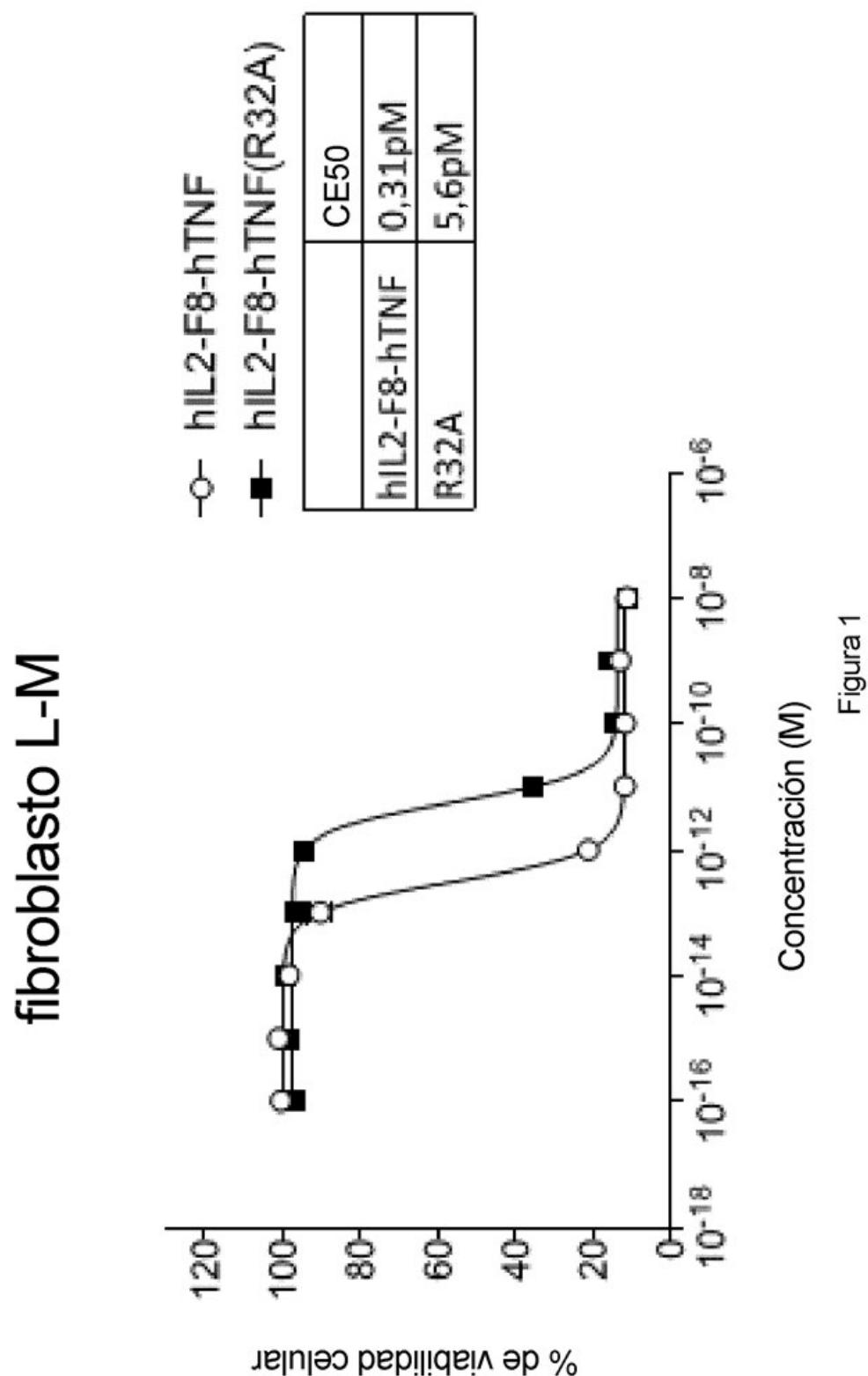


Figura 1

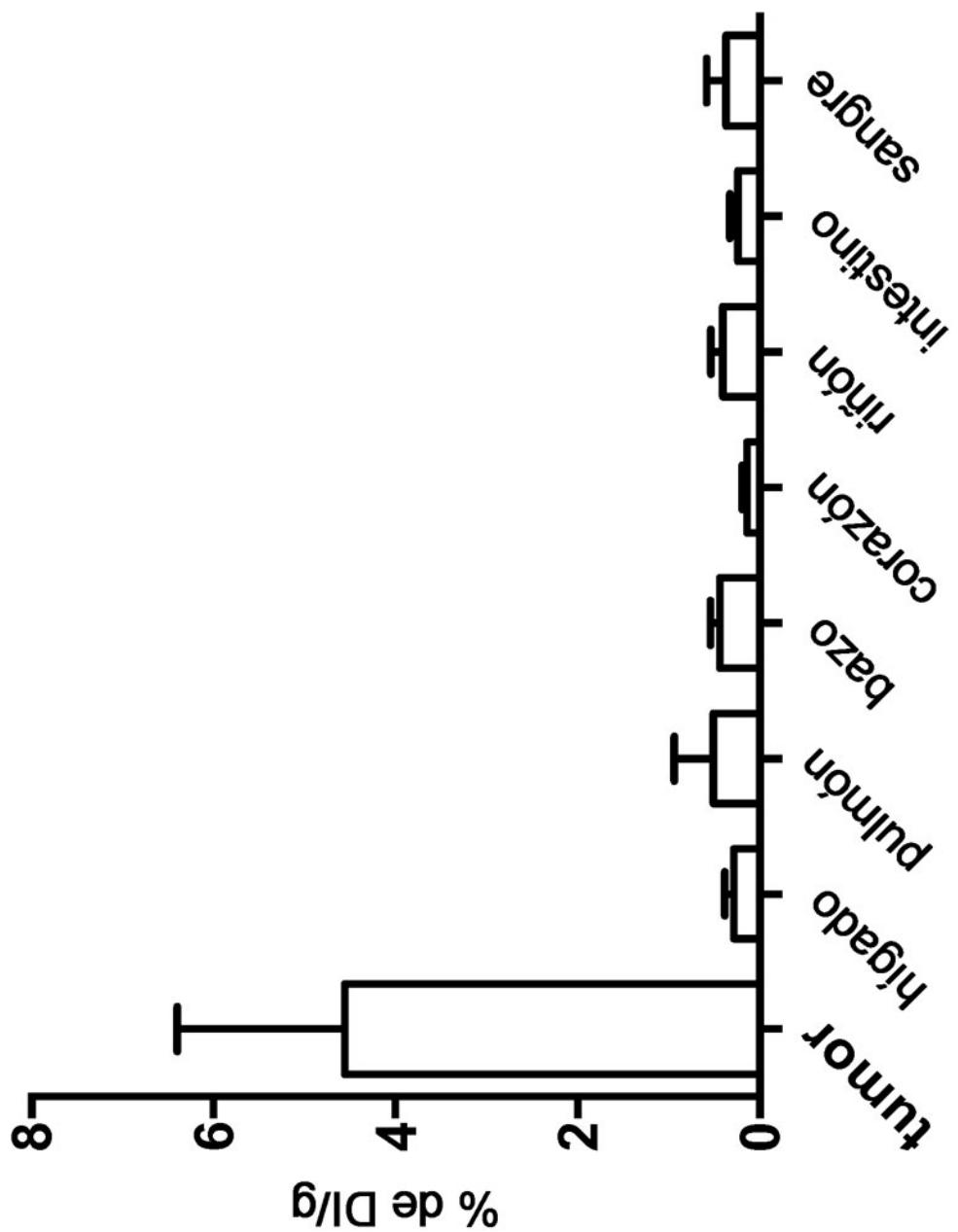


Figura 2

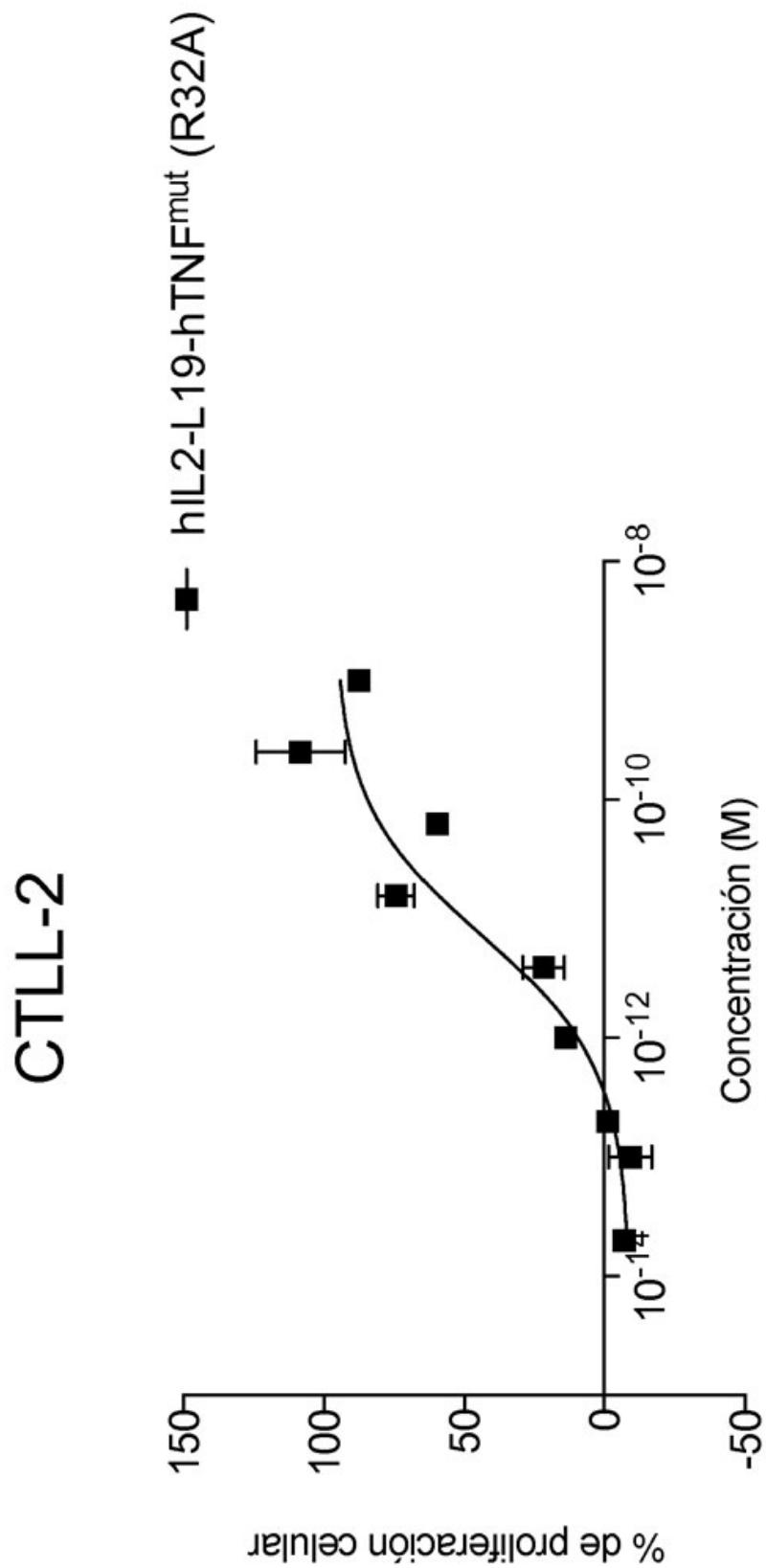


Figura 3

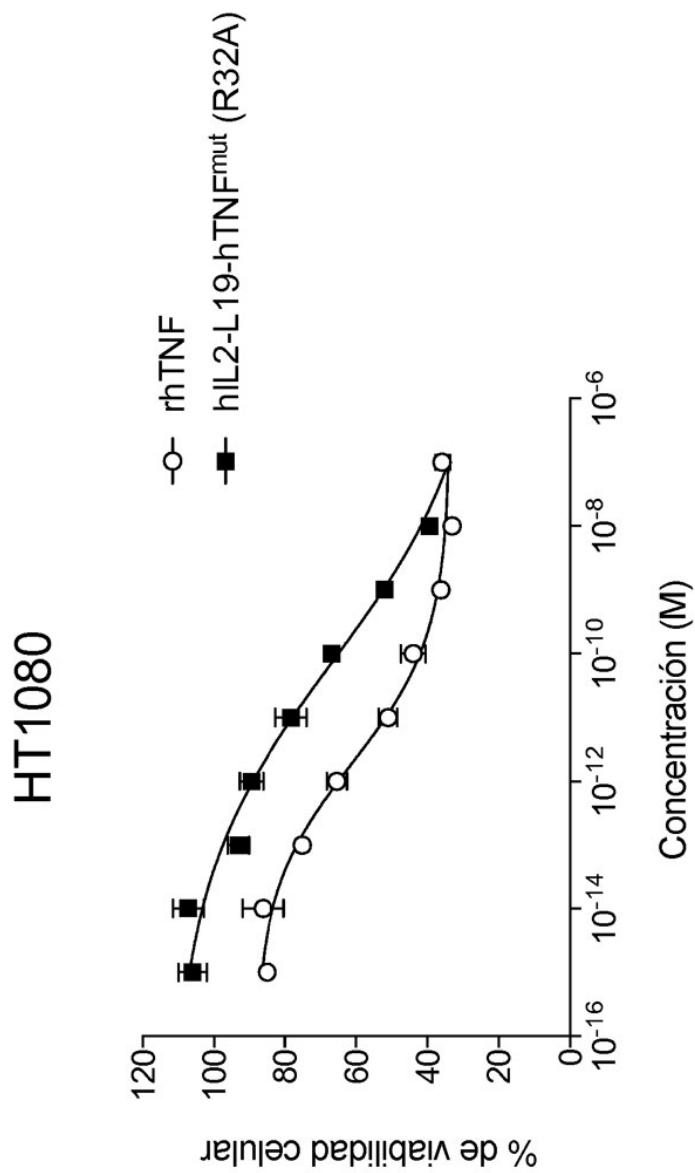
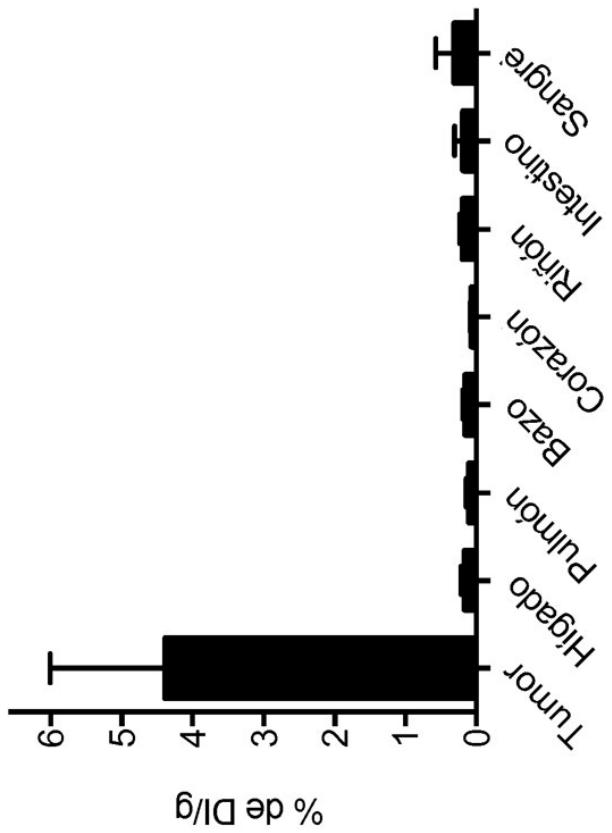


Figura 4

Biodistribución en ratones 129Sv que portan tumores F9

hIL2-L19-hTNF^{mut} (R32A) 24h



n = 3
tasa de incorporación: 18,7%
dosis inyectada: 10 µg/ratón

Figura 5