

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 000 558**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2017 PCT/KR2017/008676**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018 WO18030806**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2017 E 17839824 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 3511340**

(54) Título: **Citocina fusionada a Fc heterodímerico y composición farmacéutica que comprende la misma**

(30) Prioridad:

10.08.2016 KR 20160101823

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2025

(73) Titular/es:

**AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION (100.00%)
206, World cup-ro, Yeongtong-gu Suwon-si, Gyeonggi-do 16499, KR**

(72) Inventor/es:

**KIM, YONG SUNG;
JUNG, KEUNOK;
HA, JI HEE;
KIM, YE JIN;
CHOI, DONG KI y
CHOI, HYE JI**

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 3 000 558 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

Citocina fusionada a Fc heterodímerico y composición farmacéutica que comprende la misma

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una proteína fusionada a Fc heterodimérico que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc de un par Fc de inmunoglobulina y una proteína fisiológicamente activa, en donde una o más subunidades de la proteína fisiológicamente activa se unen al extremo N-terminal de la primera región Fc y/o la segunda región Fc, y los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc se mutan para promover la formación de heterodímeros de Fc, y una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico como se define en las reivindicaciones, específicamente: una proteína fusionada a Fc heterodimérico monovalente que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc de un par Fc (fragmento cristalizable) de inmunoglobulina y subunidades p35 (IL-12A) y p40 (IL-12B) de interleucina-12 (IL-12) humana,

15 en donde la subunidad p40 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la primera región Fc;
 en donde la subunidad p35 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la segunda región Fc mediante el enlazador peptídico (G_4S_3);
 en donde cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc se deriva de una región Fc seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas;
 20 en donde los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden cada uno, uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización, y
 en donde el uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización son triptófano en la posición 409 en el dominio CH3 de la primera región Fc, valina en la posición 399 en el dominio CH3 de la segunda región Fc, y
 25 treonina en la posición 405 en el dominio CH3 de la segunda región Fc (en donde las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU).

30 La proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que puede retener la actividad de una proteína fisiológicamente activa de origen natural, que está compuesta de dos o más proteínas de subunidades diferentes y de esta manera exhibe la actividad biológica intacta al formar una proteína ensamblada, porque cada subunidad de la proteína puede fusionarse por separado a cada cadena de Fc heterodimérico de inmunoglobulina de manera que la proteína fusionada puede mantener la forma y estructura de origen natural en el grado más alto posible.

35 Cuando se usa la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención, existe una ventaja en que la semivida *in vivo* de la proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico puede aumentarse significativamente debido a la semivida larga mediada por Fc de manera que las actividades fisiológicas de estas *in vivo* puede durar mucho tiempo.

40 Además, la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención tiene una estructura en la que una o más subunidades de la proteína fisiológicamente activa se fusionan al extremo N-terminal de un Fc heterodimérico de inmunoglobulina, y la proteína fusionada a Fc heterodimérico se purifica fácilmente después de su expresión, en comparación con una proteína de fusión de tipo silvestre basada en Fc.

45 Técnica anterior

El documento WO2014/145907 A1 se refiere a métodos y composiciones para modular células T. La modulación incluye suprimir o inducir células T reguladoras o células T citotóxicas.

50 El documento US2010/015089 A1 se refiere a métodos para producir proteínas de fusión con la citocina heterodimérica, interleucina-12.

55 Gillies y otros (The Journal of Immunology, vol. 160, núm. 12, 15 de junio de 1998, páginas 6195-6203, XP002106576) se refiere a que las proteínas de fusión de anticuerpo-IL-12 son efectivas en modelos de ratón SCID de metástasis de carcinoma de próstata y colon.

60 J.H. Davis y otros (Protein engineering design and selection, vol. 23, núm. 4, 1 de abril de 2010, páginas 195-202, XP055018770) se refiere a proteínas de fusión basadas en heterodímeros CH3 de dominio manipulado genéticamente de intercambio de hebras (SEED) en una plataforma análoga de Fc para uniones asimétricas o inmunofusiones y anticuerpos biespecíficos.

65 Kannan Gunasekaran y otros (JBC Papersin Press, 16 de abril de 2010, páginas 1-20, XP055569730) se refiere a mejorar la formación de heterodímeros FC de anticuerpos mediante efectos de dirección electrostática: aplicaciones a moléculas biespecíficas e IgG monovalente.

5 Los anticuerpos humanos de origen natural (inmunoglobulina G (IgG), IgM, IgD, IgE e IgA) están presentes cada uno como un conjunto de dos cadenas pesadas que tienen la misma secuencia de aminoácidos y dos cadenas ligeras que tienen la misma secuencia. Con respecto a esto, la homodimerización entre las dos cadenas pesadas idénticas se induce por las interacciones no covalentes entre los dominios terminales de la región constante (dominios CH3 en IgG, IgD e IgA, dominios CH4 en IgM, y dominios CH2 y CH4 en IgE) y el enlace disulfuro entre los dominios de bisagra.

10 La tecnología de Fc heterodimérico de anticuerpos es una tecnología que hace fragmentos cristalizables heterodiméricos (Fc) de regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina mediante modificaciones en la interfaz del dominio CH3, con diferentes mutaciones en cada dominio de manera que los fragmentos Fc manipulados genéticamente, que portan el par de variantes CH3, forman preferentemente heterodímeros de Fc en anticuerpos de origen natural (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) en lugar de homodímeros de Fc. Más específicamente, es una tecnología que induce mutaciones en dos dominios CH3 diferentes de Fc mediante ingeniería genética, de manera que los dos fragmentos Fc forman un heterodímero con variaciones de secuencia mínimas al tiempo que tienen estructuras terciarias muy similares a las de los anticuerpos de origen natural (patente de Estados Unidos núm. 7,695,936; y patente de Corea núm. 1,522,954). La tecnología de Fc heterodimérico es una tecnología de plataforma para fabricar anticuerpos biespecíficos, y los mutantes del dominio CH3 que inducen la formación de heterodímeros de Fc conocidos hasta ahora se generaron principalmente mediante la introducción de un par de mutaciones asimétricas en la interfaz del dominio CH3 mediante el diseño racional basado en la estructura del anticuerpo (Spreiter Von Kreudenstein y otros, 2014). Los estudios pioneros incluyen la tecnología de botón en ojal (Ridgway y otros, 1996) de Genentech, y muchas compañías farmacéuticas multinacionales, que incluyen Zymeworks (ZW1; Von Kreudenstein y otros, 2013), Xencor (HA-TF; Moore GL y otros, 2011) y EMD Serono (SEEDbody; Davis JH y otros, 2010), han desarrollado e informado la tecnología de plataforma.

25 Sobre todo, la variante A107 usada en la presente invención es un heterodímero de Fc de alto rendimiento que se selecciona de una biblioteca de Fc heterodimérico de anticuerpos humanos que se construye mediante el uso de un sistema de presentación de superficie celular de levadura, y es una variante de Fc heterodimérico que promueve la formación heterodimérica mediante la inducción de mutaciones en aminoácidos cargados para formar interacciones hidrófobas estéricamente complementarias ($K409W_{CH3A}$ - $D399V/F405T_{CH3B}$) y formando enlaces de hidrógeno ($K370E_{CH3A}$ - $E357N_{CH3B}$), al tiempo que se mantiene la integridad del núcleo hidrófobo en la interfaz del dominio CH3 (Choi y otros 2016; solicitud de patente de Corea núm. 2015-0142181).

30 Las variantes de Fc heterodimérico informadas hasta ahora, que incluyen la variante A107, se basan todas en que IgG1 ocupa la mayor proporción de isotipos de anticuerpos humanos, y las variantes de isotipos (IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM e IgE) distintas de IgG1 aún no se han informado.

35 Esto se debe a que los anticuerpos terapéuticos que se comercializan bajo la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) adoptan principalmente el isotipo de IgG1 (Irani y otros 2015). En los últimos años, para los anticuerpos moduladores de la inmunidad o las proteínas de fusión de agonistas del receptor que no necesitan tener grandes funciones efectoras de anticuerpos tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC), se han desarrollado proteínas terapéuticas en base a IgG2 o IgG4 cuyas funciones efectoras son significativamente menores que las de IgG1.

40 45 Mientras tanto, las proteínas fisiológicamente activas tienen en su mayoría tamaños pequeños y, por lo tanto, tienen la desventaja de tener una semivida corta *in vivo*. Para resolver este inconveniente, ha habido un intento de conjugar PEG (polietilenglicol) o similar, o fusión a una región Fc de anticuerpo (fragmento cristalizable). Sin embargo, aún no ha sido posible desarrollar proteínas fisiológicamente activas cuya actividad se mantiene eficientemente y suficientemente durante un largo período de tiempo. En particular, para proteínas compuestas de dos o más subunidades diferentes, en donde las dos o más subunidades diferentes forman un complejo proteico para exhibir actividad fisiológica, nunca ha sido posible desarrollar proteínas fusionadas con Fc que se forman para tener estructuras de complejos proteicos originales de origen natural con Fc de tipo silvestre debido a la naturaleza homodimérica de Fc. Por lo tanto, el Fc de tipo silvestre no es adecuado para la fusión Fc para proteínas heterodiméricas o heterooligoméricas para exhibir adecuadamente la actividad de las proteínas originales y mantener suficientemente su actividad durante un largo período de tiempo.

50 55 60 En este contexto técnico, los presentes inventores han construido variantes de heterodímeros que comprenden regiones Fc derivadas no solo de IgG1, sino también de otros anticuerpos de isotipo tales como IgG2, IgG3 e IgG4, que anteriormente no se informaron, y han usado estas variantes de heterodímeros para desarrollar una proteína de fusión terapéutica novedosa en forma de una proteína fusionada a Fc heterodimérico en donde una o más subunidades de una proteína, que está compuesta de dos o más subunidades diferentes y en la que dos o más subunidades exhiben actividad fisiológica al formar un complejo proteico, se fusionan genéticamente al extremo de la región Fc, para completar de esta manera la presente invención.

En particular, en la presente invención, la interleucina-12 (IL-12) se usa como la proteína que está compuesta de dos subunidades diferentes, p35 y p40, en donde las dos subunidades exhiben actividad fisiológica al formar la proteína IL-12.

5 La IL-12 puede matar directamente los tumores al aumentar la actividad de células inmunitarias tales como linfocitos T citotóxicos (CTL) o células asesinas naturales (NK) entre las células inmunitarias, o puede inhibir la tumorogénesis al activar las respuestas inmunitarias a través de la secreción de citocinas proinflamatorias tales como interferón-gamma (IFN- γ) en microambientes tumorales donde se inhiben las respuestas inmunitarias. Por lo tanto, la IL-12 se ha estudiado mucho como una citocina anti-cáncer (Lasek y otros, 2014). Sin embargo, en el desarrollo de métodos terapéuticos mediante el uso de IL-12, la semivida corta de la propia citocina requiere una administración frecuente, lo que puede provocar toxicidad. Por esta razón, se han realizado estudios para fusionar IL-12 con un anticuerpo o Fc con el fin de usarlo como IL-12 de acción prolongada (Tugues y otros, 2015). Sin embargo, en estos estudios, surge un problema debido a que, debido a la fusión de un anticuerpo basado en Fc de tipo silvestre que forma un homodímero por la interacción entre dominios CH3, la proteína IL12 fusionada es bivalente, a diferencia de una forma monovalente endógena de IL-12, y por esta razón, el anticuerpo basado en Fc de tipo silvestre fusionado con IL-12 muestra una actividad fisiológica más pobre que la IL-12 endógena, o aparece una localización no deseada debido a la unión aumentada impulsada por la avidez de IL-12 a células inmunitarias (Tzeng y otros, 2015; Dumont y otros, 2006).

20 Por lo tanto, en un esfuerzo por hacer una proteína de fusión monovalente mediante el uso de un anticuerpo de tipo silvestre o una región Fc, como se muestra en las Figuras 1(A) a 1(C), se ha usado un método de construcción de una proteína de fusión a través de una estrategia tal como fusionar una etiqueta selectiva para purificación adicional solo al extremo C-terminal de una sola región Fc o fusionar una región Fc y una proteína entre sí después de purificarlas por separado con alta pureza. Sin embargo, este método no solo es muy costoso para producir una gran cantidad de proteína, sino que también requiere investigación para optimizar un proceso de purificación adicional.

25 Sin embargo, el uso de una proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención hace posible producir fácilmente una proteína fusionada a Fc heterodimérico monovalente como se muestra en la Figura 2 sin necesidad de optimizar un proceso de purificación adicional.

30 Descripción de la invención

Problema técnico

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar una proteína fusionada a Fc heterodimérico novedosa, cuya proteína está compuesta de una, dos o más subunidades diferentes y de esta manera exhibe la actividad biológica intacta al formar la proteína ensamblada, y por lo tanto puede mantener la actividad fisiológica natural de la proteína fusionada de esta *in vivo* durante un largo período de tiempo. En particular, la invención se define en las reivindicaciones y se dirige a una proteína fusionada a Fc heterodimérico monovalente que comprende una primera 40 región Fc y una segunda región Fc de un par de Fc de inmunoglobulina (fragmento cristalizable) y subunidades p35 (IL-12A) y p40 (IL-12B) de interleucina-12 (IL-12) humana,

en donde la subunidad p40 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la primera región Fc;
en donde la subunidad p35 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la segunda región Fc mediante el enlazador peptídico (G₄S)₃;

45 en donde cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc se deriva de una región Fc seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas;
en donde los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden cada uno, uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización, y
en donde el uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización son triptófano en la posición 409 en el 50 dominio CH3 de la primera región Fc, valina en la posición 399 en el dominio CH3 de la segunda región Fc, y treonina en la posición 405 en el dominio CH3 de la segunda región Fc (en donde las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU).

55 En particular, la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención se forma de manera que puede retener la actividad de una proteína fisiológicamente activa de origen natural, en la que dos o más subunidades se ensamblan juntas para formar una proteína que exhibe actividad fisiológica, de manera que la proteína fusionada puede mantener la forma y estructura de origen natural en el grado más alto posible.

60 Además, la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que la semivida *in vivo* de la proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico puede aumentarse significativamente debido a la semivida larga mediada por Fc de manera que las actividades fisiológicas de estas *in vivo* pueden durar mucho tiempo.

65 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico descrita anteriormente, y una composición para su uso en un método terapéutico para tratar enfermedades, particularmente cáncer, mediante el uso de la misma.

Solución técnica

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una proteína fusionada a Fc heterodimérico que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc de un par Fc de inmunoglobulina y una proteína fisiológicamente activa,

en donde la proteína fisiológicamente activa está compuesta por dos o más subunidades diferentes, en donde las dos o más subunidades diferentes exhiben actividad fisiológica al formar un complejo de proteínas,
 en donde las subunidades de una proteína fisiológicamente activa se unen o se fusionan genéticamente al extremo N-terminal de la primera región Fc y/o la segunda región Fc,
 en donde los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc se mutan para promover la formación de heterodímeros de Fc.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico descrita anteriormente, y una composición para su uso en un método terapéutico para tratar enfermedades, particularmente cáncer, mediante el uso de la misma.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona una proteína fusionada a Fc heterodimérico monovalente que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc de un par de Fc de inmunoglobulina (fragmento cristalizable) y subunidades p35 (IL-12A) y p40 (IL-12B) de interleucina-12 (IL-12) humana,

en donde la subunidad p40 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la primera región Fc;
 en donde la subunidad p35 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la segunda región Fc mediante el enlazador peptídico (G4S)3;
 en donde cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc se deriva de una región Fc seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas;
 en donde los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden cada uno, uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización, y
 en donde el uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización son triptófano en la posición 409 en el dominio CH3 de la primera región Fc, valina en la posición 399 en el dominio CH3 de la segunda región Fc, y treonina en la posición 405 en el dominio CH3 de la segunda región Fc (en donde las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico descrita anteriormente.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en terapia.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, linfoma y cáncer de sangre.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método, en donde el método comprende la terapia combinada con otros fármacos contra el cáncer.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1(A) a 1(C) ilustran las estrategias convencionales para obtener proteínas de fusión monoméricas y heterodiméricas mediante el uso de Fc de tipo silvestre de anticuerpo de IgG humana. (A) Dímero de Epo-Fc basado en Fc de tipo silvestre frente a monómero de Epo-Fc. (B) Péptido monomérico de GLP-1/GCG fusionado con Fc no glucosilado, generado por la tecnología LAPscovery. (C) Homodímero en tandem Fc-FSH basado en Fc de tipo silvestre frente a heterodímero Fc-FSH. Epo, eritropoyetina; GLP-1/GCG, péptido-1 similar al glucagón/glucagón; FSH, hormona estimulante del folículo.

La Figura 1(D) muestra un ejemplo de la construcción de un anticuerpo-citocina (inmunocitocina) mediante la fusión de una citocina monomérica (IL2) a un anticuerpo de tipo IgG que comprende una variante de Fc heterodimérico de botón en ojal (KiH) de acuerdo con la literatura anterior.

Las Figuras 2(A) y 2(B) ilustran formas de proteínas de fusión monoméricas y heterodiméricas que pueden construirse mediante el uso de un Fc heterodimérico. Uso potencial de Fc heterodimérico para la generación de proteínas monoméricas o heterodiméricas fusionadas con Fc para presentar la pareja de fusión en su forma

natural. El monómero fusionado con Fc puede generarse fácilmente mediante la fusión de la proteína monomérica al extremo N-terminal o al extremo C-terminal (ejemplo de referencia) de una cadena de Fc heterodimérico.

5 La Figura 2(C) ilustra una proteína de fusión formada por la fusión de un heterodímero a un anticuerpo humano de tipo IgG que comprende un Fc heterodimérico. El heterodímero fusionado con Fc puede generarse mediante la fusión separada de las dos subunidades de proteínas heterodiméricas a cada cadena del Fc heterodimérico en el extremo N-terminal o extremo C-terminal (ejemplo de referencia).

10 La Figura 3 muestra la alineación de secuencias del dominio CH3 de anticuerpos de isotipo de IgG humana (hlgG1, hlgG2, hlgG3, hlgG4) con resaltado de los residuos mutados en la variante de Fc heterodimérico A107 (K370E/K409W_{CH3A}-E357N/D399V/F405T_{CH3B}).

15 La Figura 4 muestra los resultados de realizar el modelado estructural de variantes de Fc heterodimérico para cada isotipo mediante el uso de secuencias que tienen mutaciones inducidas en las posiciones seleccionadas en la Figura 3 y el análisis de las estructuras de modelado resultantes comparativamente con variantes A107 basadas en IgG1 de tipo silvestre.

20 La Figura 5 es una vista esquemática de un vector para expresar un Fc heterodimérico para cada isotipo, construido mediante análisis de secuencia y estructura, en células animales. La variante de Fc heterodimérico para cada isotipo, que comprende una región bisagra mutada, se clonó en el vector mediante el uso de enzimas de restricción (NotI/HindIII).

25 La Figura 6 muestra esquemáticamente un sistema de expresión scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} para evaluar la capacidad de las variantes de Fc heterodimérico para formar un heterodímero, mediante la diferencia de tamaño del dímero entre las proteínas expresadas.

30 La Figura 7 es una vista esquemática para clonar scFv-Fc fusionado a un fragmento variable de cadena simple (scFv), construido para evaluar el rendimiento de formación de heterodimerización de un Fc de anticuerpo por un par de mutantes CH3 como se muestra en la Figura 6, en un vector pcDNA3.1 que es un vector de expresión celular animal.

35 La Figura 8 mostrar los resultados de la cotransfección de pares de mutantes de CH3 introducidos en vectores de expresión de células animales, construidos de acuerdo con los sistemas de expresión mostrados en las Figuras 5 y 7, en células HEK293F para evaluar la formación de heterodimerización como se muestra en la Figura 6, expresar y purificar transitoriamente los vectores, y después separar 5 µg de proteína en SDS-PAGE en condiciones no reductoras para evaluar la formación de heterodimerización, y analizar la proteína de acuerdo con el tamaño y la combinación mediante tinción de azul de Coomassie. Como control negativo, se usó un Fc de tipo silvestre con CH3 de tipo silvestre.

40 Figura 9 muestra los resultados de la separación de proteínas por SDS-PAGE de acuerdo con el método que se muestra en la Figura 8, y después la realización de la transferencia Western mediante el uso de anticuerpo conjugado con IgG humana-AP.

45 La Figura 10(A) es una vista esquemática que muestra la forma de la citocina IL-12 endógena a la que no se fusionó Fc y que se usa como control en la presente invención.

50 La Figura 10(B) es una vista esquemática que muestra la forma de una proteína de fusión bi-IL-12-Fc que se obtuvo mediante la fusión de la citocina IL-12 al Fc de IgG4 de tipo silvestre mediante un enlazador de aminoácidos y que se usa como un ejemplo comparativo en la presente invención.

55 La Figura 10(C) es una vista esquemática que muestra la forma de una proteína de fusión mono-IL-12-Fc obtenida mediante la fusión de la citocina IL-12 a la variante γ4-A107 basada en IgG4 entre variantes de Fc heterodimérico para cada isotipo de acuerdo con la presente invención.

60 Las Figuras 11(A) y 11(B) son vistas esquemáticas de vectores para expresar y purificar una proteína de fusión de un ejemplo de la presente invención (Figura 10 (C)) en células animales.

65 La Figura 12 es una vista esquemática de un vector para expresar y purificar una proteína de fusión de un ejemplo de la presente invención (Figura 10 (B)) en células animales.

70 La Figura 13 muestra los resultados de la cotransfección de los vectores de expresión de células animales de las Figuras 11(A) y 11(B), construidos mediante el uso de genes de interleucina humana y de ratón, en células HEK293F, que expresan y purifican transitoriamente los genes y después separar 5 µg de proteína en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y analizar la proteína de acuerdo con el tamaño y la combinación mediante tinción de azul de Coomassie.

75 La Figura 14 muestra los resultados del análisis de las proteínas de fusión de la Figura 13 mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

80 La Figura 15 muestra los resultados del análisis FACS realizado para analizar las afinidades de unión de mono-hIL-12-Fc y bi-hIL-12-Fc de tipo silvestre en PMBC normales que no tienen receptor de IL-12 y PBMC activadas por PHA en los que el receptor de IL-12 se indujo mediante el tratamiento con el mitógeno PHA (fitohemaglutinina).

85 La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular WST-1 realizado para medir el efecto de varias concentraciones de Fc (A107), IL-12 humana recombinante (rhIL-12), bi-hIL-12-Fc y mono-hIL-12-Fc sobre la proliferación de PBMC activadas por PHA en los que el receptor de IL-12 se indujo mediante el tratamiento con el mitógeno PHA.

90 La Figura 17 muestra los resultados de un ELISA realizado para medir la concentración de IFN-γ en sobrenadantes de cultivo obtenidos como se muestra en la Figura 16.

95 La Figura 18 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir las afinidades de unión de mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc en PMBC normales que no tienen receptor de IL-12 y PBMC activadas por PHA en los que el receptor de IL-12 se indujo mediante el tratamiento con el mitógeno PHA, porque mIL-12 reacciona de forma cruzada con el receptor de IL-12 humano en células T humanas y células NK activadas.

- La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular WST-1 realizado para medir el efecto de varias concentraciones de Fc(A107), IL-12 recombinante de ratón (rmIL-12), bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc sobre la proliferación de PBMC activadas por PHA en los que el receptor de IL-12 se indujo mediante tratamiento con el mitógeno PHA.
- 5 La Figura 20(A) muestra los cambios en el volumen tumoral en ratones Balb/c trasplantados con tumor CT26^{HER2}/Neu durante la administración intraperitoneal de Fc (A107), rmIL-12, bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc, y la imagen de los ratones portadores de tumores después del sacrificio al final de la administración. La inyección de proteínas mIL12-Fc se inició 11 días después de la inoculación de células tumorales cuando el volumen tumoral alcanzó 100 mm³.
- 10 La Figura 20(B) es un gráfico que muestra los cambios del peso corporal de ratón medido en los puntos de tiempo indicados en el procedimiento experimental mostrado en la Figura 20(A).
- 15 La Figura 21(A) muestra los resultados de la medición de los cambios en el volumen tumoral de ratón medidos mientras se administran por vía intraperitoneal varias concentraciones de bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc, dos veces a la semana, cuando el volumen del tumor en ratones Balb/c trasplantados con CT26^{HER2}/Neu alcanzó 300 mm³.
- 20 La Figura 21(B) es un gráfico que muestra los cambios del volumen tumoral individual de ratón tratado con proteínas mIL12-Fc en los puntos de tiempo indicados en el procedimiento experimental mostrado en la Figura 21(A).
- 25 La Figura 21(C) muestra la imagen de tumores extraídos de ratones portadores de tumores 3 días después de la última administración en la Figura 21(A).
- 30 La Figura 21(D) es un gráfico que muestra los cambios del peso corporal de los ratones medido en los puntos de tiempo indicados en el procedimiento experimental mostrado en la Figura 21(A).
- 35 La Figura 21(E) es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la alanina aminotransferasa (ALT) (que es un marcador de hepatotoxicidad) en la sangre que se recogió de las venas faciales de ratón 1 día después de la última administración en la Figura 21(A). La Figura 22(A) es un gráfico que muestra los resultados de la medición de los aumentos en el número de células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK en los bazos de ratones sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A).
- 40 La Figura 22(B) es un gráfico que muestra el número de células inmunitarias totales, células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que se infiltraron en el tumor en ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A).
- 45 La Figura 23(A) muestra los resultados de un ELISA realizado para medir los niveles séricos de IFN-γ en ratón portador de tumor CT26^{HER2}/neu tratado con proteínas mIL-12-Fc. El suero de ratón se separó después de coagular la sangre recogida de las venas faciales de ratón 24 horas después de la última administración en la Figura 21(A).
- 50 La Figura 23(B) es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA realizado para medir la concentración de IFN-γ en suero separado de sangre recolectada de venas faciales de ratón el 1, 3 y 5 días después de administrar intraperitonealmente bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc a una concentración equimolar a 1 µg de rmIL-12 cuando el volumen tumoral en ratones Balb/c trasplantados con células cancerosas CT26^{HER2}/Neu alcanzaron 300 mm³.
- 55 La Figura 23(C) es un gráfico que muestra los resultados de la medición del efecto citotóxico de células T citotóxicas, aisladas del bazo de ratones sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A), contra células cancerosas CT26^{HER2}/Neu. La Figura 23(D) muestra la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ esplénicas aisladas de ratón portador de tumor CT26-HER2/neu tratado con proteínas mIL-12-Fc, analizadas 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A), seguido de 4 h de cultivo con células cancerosas CT26^{HER2}/Neu que expresan antígeno tumoral y células 4T1 que no expresan antígeno tumoral.
- 60 La Figura 23(E) es un gráfico que muestra los resultados de la medición del efecto citotóxico de las células asesinas naturales, aisladas del bazo de ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A), contra células cancerosas CT26^{HER2}/Neu. La Figura 24(A) es un gráfico que muestra los resultados de medir el número de células T efectoras CD8⁺ aisladas del bazo aislado de ratones portadores de tumores sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A).
- 65 La Figura 24(B) es un gráfico que muestra los resultados de la medición del número de células T de memoria efectoras CD8⁺ en el bazo aisladas de ratones portadores de tumores sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A).
- La Figura 24(C) es un gráfico que muestra los resultados de medir el número de células T de memoria central CD8⁺ en el bazo aisladas de ratones portadores de tumores sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A).
- La Figura 24(D) muestra los resultados obtenidos mediante el retransplante de células cancerosas CT26^{HER2}/Neu en ratones Balb/c sobrevivientes a los 120 días después de la administración de 1 µg de mono-IL-12-Fc en la Figura 21(A), y medir los cambios en el volumen tumoral en los ratones. La Figura 24(E) muestra los resultados de la citometría de flujo realizada para analizar la proporción de células efectoras precursoras de memoria (KLRG1⁻ IL-7R⁺) y células efectoras de vida corta (KLRG1⁺IL-7R⁻) entre células T CD8⁺ en el bazo aisladas de ratones portadores de tumores sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A).
- La Figura 25(A) es un gráfico que muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir la proporción de células T CD8⁺ (que mostraron una alta expresión del factor de transcripción T-bet que inhibe la diferenciación de células de memoria) en células del bazo aisladas de ratones sacrificados el 3er día después de la tercera administración en la Figura 21(A).

- La Figura 25(B) es un gráfico que muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir la proporción de células T CD8⁺ (que mostraron una alta expresión de Eomes y una baja expresión de T-bet) en células del bazo aisladas de ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A). La Figura 25(C) es un gráfico que muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir el nivel de expresión de STAT4 fosforilado en células T CD8⁺ aisladas de los ganglios linfáticos de drenaje del tumor (inguinales) a las 24 horas después de administrar intraperitonealmente bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc una vez a una concentración equimolar a 1 µg rML-12 cuando el volumen tumoral en ratones Balb/c trasplantados con células cancerosas CT26^{HER2Neu} alcanzaron 300 mm³. La Figura 25(D) es un gráfico que muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir la proporción de células T CD8⁺ (que expresaron T-bet que inhibe la diferenciación de células de memoria) en ganglios linfáticos (inguinales) de drenaje del tumor a las 72 horas después de la única administración intraperitoneal en la Figura 25(C). La Figura 25(E) es un gráfico que muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir el nivel de expresión de pSTAT4 cuando las células T CD8⁺ aisladas del bazo y el ganglio linfático inguinal de ratones Balb/c normales se estimularon con la mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc que reaccionaron de forma cruzada con el anticuerpo anti-Fc. La Figura 25(F) es un gráfico que muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir la proporción de células T CD8⁺ que expresan T-bet cuando las células T CD8⁺ aisladas del bazo y el ganglio linfático de la ingle de ratones Balb/c normales se estimularon con la mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc que reaccionaron de forma cruzada con el anticuerpo anti-Fc.
- La Figura 26 es una vista esquemática general que muestra un mecanismo que induce la diferenciación de células efectoras precursoras de memoria mediante mono-mIL-12-Fc y un mecanismo que induce la diferenciación de células efectoras de vida corta mediante bi-mIL-12-Fc.
- 25 Mejor modo para llevar a cabo la invención**
- A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que los que generalmente entiende un experto en la técnica a la que se refiere la invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente descripción y los métodos experimentales, que se describirán más abajo, son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.
- En un aspecto, la presente invención se refiere a una proteína fusionada a Fc heterodimérico que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc de un par Fc de inmunoglobulina y una proteína fisiológicamente activa,
- 35 en donde la proteína fisiológicamente activa está compuesta por dos o más subunidades diferentes, en donde las dos o más subunidades diferentes exhiben actividad fisiológica al formar un complejo de proteínas, en donde una o más subunidades de una proteína fisiológicamente activa se unen a uno o más extremos del extremo N-terminal de la primera región Fc y/o la segunda región Fc,
- 40 en donde los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc están mutados para promover la formación de heterodímeros.
- Como se usa en la presente, el término "región Fc" o "región constante de cadena pesada" significa una región que comprende un dominio CH2 de inmunoglobulina, un dominio CH3 y un dominio de bisagra. Sin embargo, para IgE, el término significa una región que comprende un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4 y un dominio bisagra.
- 45 Como se usa en la presente descripción, la expresión "la primera región Fc y la segunda región Fc se mutan para promover la formación de heterodímeros" significa que un anticuerpo de origen natural tiene una forma homodimérica en la que dos regiones Fc tienen la misma secuencia, y una porción de estas secuencias de la región Fc se muta, de manera que la formación de heterodímeros puede promoverse a través de una interacción no covalente específica entre la primera región Fc y la segunda región Fc, o la formación de homodímeros puede reducirse, o preferentemente puede producirse con dificultad.
- 50 "La primera región Fc y la segunda región Fc se mutan para promover la formación de heterodímeros" incluye "cada uno de los dominios CH3 contenidos en la primera región Fc y la segunda región Fc de inmunoglobulina se muta para promover la formación de heterodímeros de Fc".
- 55 En la presente invención, "Fc heterodimérico o heterodímero de Fc" comprende la primera región Fc y la segunda región Fc, y la primera región Fc y la segunda región Fc significan heterodímeros en los que los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc se mutan para promover la formación de heterodímeros de Fc.
- 60 En la presente invención, cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc se deriva de una región Fc seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.
- 65 Además, la primera región Fc y la segunda región Fc pueden derivarse de un anticuerpo de isotipo.

- En la presente invención, los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden cada uno, uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización. La sustitución del residuo de aminoácido en la posición K409 en el dominio CH3 de la primera región Fc es K409W, la sustitución del residuo de aminoácido en la posición F405 en el dominio CH3 de la segunda región Fc es F405T y la sustitución del residuo de aminoácido en la posición D399 en el dominio CH3 de la segunda región Fc es D399V.
- En otro aspecto, la mutación del dominio CH3 puede incluir una o más mutaciones seleccionadas de (en donde todas las posiciones de mutación en la presente invención se numeran de acuerdo con el índice EU): sustitución del residuo de aminoácido en la posición K370 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y sustitución del residuo de aminoácido en la(s) posición(es) E357 y/o S364 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
- Preferentemente, la sustitución del residuo de aminoácido en la posición K370 en el dominio CH3 de la primera región Fc puede ser K370E, K370R, K370M, K370D o K370H, la sustitución del residuo de aminoácido en la posición E357 en el dominio CH3 de la segunda región Fc puede ser E357N, E357D, E357A, E357I, E357G o E357M, y la sustitución del residuo de aminoácido en la posición S364 en el dominio CH3 de la segunda región Fc puede ser S364T o S364W.
- La mutación del residuo de aminoácido tal como K370E significa que K en la posición 370 se muta a E, y la mutación de todos los residuos de aminoácidos en la presente invención se usa con el mismo significado como se describió anteriormente.
- Con la máxima preferencia, la mutación del dominio CH3 de la primera región Fc o la segunda región Fc puede incluir una o más mutaciones seleccionadas del siguiente grupo (en donde las posiciones de mutación se numeran de acuerdo con el índice EU):
- (1) una sustitución K370E, K370R, K370M, K370D o K370H del residuo de aminoácido en la posición K370 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y
 - (2) una sustitución E357N, E357D, E357A, E357I, E357G o E357M del residuo de aminoácido en la posición E357 en el dominio CH3 de la segunda región Fc, y la sustitución S364T o S364W del residuo de aminoácido en la posición S364 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
- Los dominios CH3 en la primera región Fc y la segunda región Fc pueden incluir además el siguiente residuo:
- (i) cisteína (C) sustituida en la posición Y349 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y
 - (ii) cisteína (C) sustituida en la posición S3 54 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
- En aún otro aspecto, la mutación del dominio CH3 puede incluir una sustitución del residuo de aminoácido en la posición K360 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y la sustitución del residuo de aminoácido en la posición E347 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
- Preferentemente, la sustitución del residuo de aminoácido en la posición K360 en el dominio CH3 de la primera región Fc puede ser K360E, y la sustitución del residuo de aminoácido en la posición E347 en el dominio CH3 de la segunda región Fc puede ser E347R.
- La sustitución del residuo de aminoácido en la posición K409 en el dominio CH3 de la primera región Fc es K409W, la sustitución del residuo de aminoácido en la posición F405 en el dominio CH3 de la segunda región Fc es F405T y la sustitución del residuo de aminoácido en la posición D399 en el dominio CH3 de la segunda región Fc es D399V.
- Con la máxima preferencia, la mutación del dominio CH3 de la primera región Fc o la segunda región Fc puede incluir una o más mutaciones seleccionadas del siguiente grupo (en donde las posiciones de mutación se numeran de acuerdo con el índice EU):
- (1) una sustitución K360E del residuo de aminoácido en la posición K360 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y
 - (2) una sustitución E347R del residuo de aminoácido en la posición E347 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
- Los dominios CH3 en la primera región Fc y la segunda región Fc pueden incluir además el siguiente residuo:
- (i) cisteína (C) sustituida en la posición Y349 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y
 - (ii) cisteína (C) sustituida en la posición S3 54 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
- Preferentemente, cada uno de los dominios CH3 contenidos en la primera región Fc y la segunda región Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos representadas por las siguientes SEQ ID NO:
- (1) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2;

- 5 (2) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4;
 (3) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6;
 (4) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9;
 (5) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; y
 (6) SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

En particular, la primera región Fc y la segunda región Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención tienen preferentemente las secuencias de dominios CH3 de IgG4 mostradas en la Tabla 1 más abajo.

10

Tabla 1

configuración	Secuencia CH3 de la primera región Fc (número EU 341 a 447)	Secuencia CH3 de la segunda región Fc (número EU 341 a 447)
γ 4-EWRVT	GQPREPQVYTLPPSQEEMTEN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTI ^T PPVLSDGS FFLYSWLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 1)	GQP ^R EPRVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESEN Q ^P ENNYKTI ^T PPVLVSDGSFTLYS RLTV ^D KSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 2)
configuración	Secuencia CH3 de la primera región Fc (número EU 341 a 447)	Secuencia CH3 de la segunda región Fc (número EU 341 a 447)
γ 4-EWRVT _{s-s}	GQPREPQVCTLPPSQEEMTEN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTI ^T PPVLSDGS FFLYSWLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 3)	GQP ^R EPRVYTLPPCQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESEN Q ^P ENNYKTI ^T PPVLVSDGSFTLYS RLTV ^D KSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 4)
γ 4-A107	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTI ^T PPVLSDGS FFLYSWLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 5)	GQP ^R EPRVYTLPPSQENMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESEN Q ^P ENNYKTI ^T PPVLVSDGSFTLYS RLTV ^D KSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 6)

50 En la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención, la subunidad p40 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la primera región Fc, y la subunidad p35 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la segunda región Fc mediante el enlazador peptídico (G₄S)₃.

55 En las proteínas fusionadas a Fc heterodimérico también descritas en la presente descripción como referencia, una subunidad de la proteína fisiológicamente activa puede unirse solo a un extremo del extremo N-terminal o extremo C-terminal de la primera región Fc o la segunda región Fc, y una o más subunidades diferentes de una sola proteína fisiológicamente activa pueden unirse a cada uno del extremo N-terminal y extremo C-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc (ver las Figuras 2(B) y 2(C)).

60 "Una subunidad de la proteína fisiológicamente activa se une solo a uno de los extremos del extremo N-terminal o extremo C-terminal de la primera región Fc o la segunda región Fc" descrito en la presente descripción como referencia significa que una de las subunidades de la proteína fisiológicamente activa se une solo a uno de los cuatro extremos del extremo N-terminal o extremo C-terminal de la primera región Fc o la segunda región Fc, y la(s) subunidad(es) restante(s) de la proteína fisiológicamente activa se une(n) mediante un enlazador a la subunidad de proteína fisiológicamente activa, que se une a uno de los extremos del extremo N-terminal o extremo C-terminal de la primera región Fc o la segunda región Fc. El enlazador es preferentemente un enlazador de aminoácidos, pero no se limita a ello.

- Además, "una o más subunidades diferentes de una sola proteína fisiológicamente activa se unen a cada uno del extremo N-terminal y el extremo C-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc" descrito en la presente descripción como referencia significa que una o más subunidades diferentes de una sola proteína fisiológicamente activa se unen al extremo N-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc, una o más subunidades diferentes de una sola proteína fisiológicamente activa se unen al extremo C-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc, o una o más subunidades diferentes de una sola proteína fisiológicamente activa se unen respectivamente al extremo N-terminal y al extremo C-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc.
- 5 En la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención, la subunidad de la proteína fisiológicamente activa puede unirse al extremo N-terminal de la primera región Fc y/o la segunda región Fc mediante fusión genética.
- 10 En aún otro aspecto, la subunidad de la proteína fisiológicamente activa puede estar unida a la primera región Fc y la segunda región Fc a través de un enlazador. El enlazador es preferentemente un enlazador de aminoácidos, pero no se limita a ello.
- 15 En otro aspecto más, en la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención, la proteína fisiológicamente activa se caracteriza porque está compuesta de dos o más subunidades diferentes, en donde las dos o más subunidades diferentes exhiben actividad fisiológica al formar un complejo proteico.
- 20 20 "La proteína fisiológicamente activa está compuesta de dos o más subunidades diferentes, en donde las dos o más subunidades diferentes exhiben actividad fisiológica al formar un complejo de proteínas" significa que la proteína fisiológicamente activa exhibe la actividad fisiológica deseada cuando dos o más subunidades forman un complejo de proteínas.
- 25 La proteína fisiológicamente activa es la interleucina-12 (IL-12).
- 30 30 Una proteína que está compuesta de dos o más subunidades diferentes, en donde las dos o más subunidades diferentes exhiben actividad fisiológica al formar un complejo de proteínas de acuerdo con la presente invención se describirá ahora en detalle a manera de ejemplo de IL-12 que es una proteína fisiológicamente activa.
- 35 35 La IL-12 está compuesta por dos subunidades, p35 (IL-12A) y p40 (IL-12B), y la forma fisiológicamente activa de IL-12 es p70 que es un heterodímero de p35 y p40. La IL-12 debe estar presente en forma de p70, que es el heterodímero de p35 y p40 para que la IL-12 exhiba la actividad de la misma en sistemas naturales.
- 40 En la presente invención, para imitar la forma de IL-12 de origen natural en la mayor medida posible, se incorporó la forma de una proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención.
- 45 45 Específicamente, en la proteína fusionada a Fc heterodimérico que comprende una primera región Fc y una segunda región Fc de acuerdo con la presente invención, una o más subunidades diferentes de una sola proteína fisiológicamente activa pueden enlazarse respectivamente al extremo N-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc.
- 50 50 En el caso anterior, se describirá un ejemplo de IL-12 en lo sucesivo.
- 55 Cualquiera seleccionada de las subunidades p35 y p40 de IL-12 solo puede unirse al extremo N-terminal de la primera región Fc, y la otra subunidad puede unirse al extremo N-terminal de la segunda región Fc para formar la proteína fusionada a Fc heterodimérico (ver las Figuras 2(B) y 2(C)).
- 60 55 Se descubrió que esta forma mostró *in vitro* actividad fisiológica similar a la de una proteína IL-12 recombinante convencional al tiempo que se mantiene la forma heterodimérica original de origen natural (ver Figuras 2(B), 2(C) y 10(C)).
- 65 55 En consecuencia, una proteína fusionada a Fc heterodimérico de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque la proteína fisiológicamente activa es IL-12, y porque las subunidades p35 y p40 de IL-12 se unen al extremo N-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc.
- 70 60 En otro aspecto, en la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención, el dominio de bisagra incluido en el extremo N-terminal de cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc puede caracterizarse en que los residuos de cisteína contenidos en el dominio de bisagra se mutan.
- 75 65 Preferentemente, la mutación de los residuos de cisteína en el dominio de bisagra puede caracterizarse en que los residuos de cisteína en una región de bisagra superior, distintos de los residuos de cisteína en un dominio de bisagra central para la formación de heterodímeros, se sustituyen todos con residuos de serina, pero el alcance de la presente invención no se limita a ello.

Además, en la presente invención, la primera región Fc y la segunda región Fc pueden incluirse en una forma de anticuerpo completo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

En la presente invención, el término "forma de anticuerpo completo" significa un anticuerpo intacto que comprende además un dominio CH1, un dominio VH, un dominio CL y un dominio VL, además del dominio CH2, dominio CH3 y dominio de bisagra (que comprende además el dominio CH4 para IgE) en la región Fc para IgG, IgA e IgD.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede depender del uso de una proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico.

La proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención puede ser IL-12 o una o más subunidades de la misma. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende una proteína fusionada a Fc heterodimérico que comprende IL-12 como una proteína fisiológicamente activa.

Un cáncer que puede tratarse con la composición farmacéutica para tratar el cáncer, que comprende una proteína fusionada a Fc heterodimérico que comprende IL-12 o una o más subunidades como la proteína fisiológicamente activa puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, linfoma y cáncer de sangre, pero no se limita a estos.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que puede añadirse al ingrediente activo para ayudar a formular o estabilizar la preparación y no causa efectos tóxicos adversos significativos para el paciente.

Como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o diluyente que no afecta la actividad biológica y las características de una proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención sin irritar a un paciente. Como un portador farmacéuticamente aceptable en una composición que se formula como una solución líquida, se usa un portador estéril y biocompatible. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser solución salina fisiológica, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de inyección de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol o una mezcla de dos o más de estos. Además, la composición de la presente invención puede, si es necesario, comprender otros aditivos convencionales, que incluyen antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos. Además, la composición de la presente invención puede formularse como formas inyectables tales como soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas con la ayuda de diluyentes, dispersantes, surfactantes, aglutinantes y lubricantes. Además, la composición de acuerdo con la presente invención puede formularse en forma de píldoras, cápsulas, gránulos o tabletas. Otros portadores se describen en una literatura [Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin)].

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. La composición se formula preferentemente para la inyección parenteral. La composición puede formularse como un sólido, una solución, una microemulsión, un liposoma u otras estructuras ordenadas adecuadas para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propileneglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de estos. En algunos casos, la composición puede contener un agente isotónico, por ejemplo, azúcar, polialcohol, por ejemplo, sorbitol o cloruro de sodio. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la proteína fusionada a Fc heterodimérico en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración estéril. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de un compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el liofilizado, que producen un polvo del ingrediente activo y cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril de este.

Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral a pacientes que padecen a una dosis y frecuencia que pueden variar con la gravedad de los pacientes que padecen. Las composiciones pueden administrarse a pacientes que lo necesiten como un bolo o mediante infusión continua. En otro ejemplo, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía rectal, intravenosa, subcutánea, intrauterina o intracerebrovascular, pero no se limita a ello.

Además, una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende una proteína fusionada a Fc heterodimérico de inmunoglobulina que incluye IL-12 puede usarse para la terapia combinada con otros fármacos contra el cáncer. Otros fármacos contra el cáncer son preferentemente células T citotóxicas y/o células asesinas

naturales (NK), pero sin limitarse a ellas, y todos los fármacos contra el cáncer que pueden usarse en la técnica a la que pertenece la presente invención pueden usarse para la terapia combinada.

En particular, cuando una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende una proteína fusionada a Fc heterodimérico de inmunoglobulina que incluye IL-12, se usa para la terapia combinada con células T citotóxicas y/o células asesinas naturales (NK), puede inducir:

- (1) un aumento en la secreción de citocinas mediante la estimulación de las células T o células asesinas naturales (NK);
- (2) un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL);
- (3) un aumento en el número de linfocitos T citotóxicos (CTL) y/o células asesinas naturales;
- (4) un aumento en la introducción de linfocitos alrededor de un tumor; o
- (5) un aumento en la señalización de IL-12R beta1 e IL-12R beta2 de linfocitos *in vivo*.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención para tratar o prevenir enfermedades.

De manera similar al caso de la composición, una enfermedad que puede tratarse o prevenirse depende del uso de una proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico. Cuando una o más subunidades de una proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención son una o más subunidades de IL-12, la presente invención proporciona el uso de la composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer o el método de prevención para un paciente que padece de cáncer, particularmente un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, linfoma y cáncer de sangre.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. A un experto en la técnica le resultará obvio que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Diseño de variantes del dominio CH3 de Fc de anticuerpo para la formación de heterodímeros para cada isotipo de inmunoglobulina humana (secuenciación)

Para fabricar fragmentos de Fc heterodiméricos para cada isotipo de inmunoglobulina humana mediante la introducción de mutaciones en el dominio CH3 que favorecen la formación de heterodímeros, la similitud de la secuencia de aminoácidos entre los dominios CH3 que desempeñan un papel importante en las interacciones para la formación de heterodímeros se analizó primero como se describe más abajo. Con respecto a esto, la variante de Fc heterodimérico (A107) se generó mediante la introducción de mutaciones asimétricas en la interfaz homodimérica de CH3 para generar el par heterodimérico CH3A:CH3B (en la presente invención, CH3A y CH3B significan el dominio CH3 de la primera región Fc y la región CH3 de la segunda región Fc, respectivamente) mediante una estrategia publicada en la literatura o documentos de patentes anteriores (Choi y otros 2016; solicitud de patente de Corea núm. 2015-0142181), de manera que la heterodimerización de CH3A:CH3B hace que la variante Fc forme el heterodímero en alto rendimiento. La Figura 3 alinea y compara las secuencias de dominios CH3 para cada isotipo de anticuerpo inmunoglobulina G (IgG) humana. Cada secuencia de aminoácidos se obtuvo del sistema de información de InmunoGenética Internacional (IMGT; URL: <http://www.imgt.org/>). En particular, entre varios alotipos, la secuencia de G3m(s,t) cuya semivida sérica se informó que se mantenía en niveles similares a los de otros isotipos de IgG se usó para IgG3 (Stapleton NM y otros, 2011).

Los resultados de la secuenciación indicaron que IgG4 tiene una secuencia conservada en todos los isotipos, excepto que el aminoácido en la posición 409 entre las posiciones en las que se introduce la mutación A107 es arginina, a diferencia de los de IgG1, IgG2 e IgG3. En consecuencia, las posiciones que tienen el mismo número de secuencia de aminoácidos se seleccionaron como posiciones para introducir el par de mutaciones A107 en isotipos distintos de IgG1. Todas las posiciones de aminoácidos en la presente invención se numeran de acuerdo con el índice EU.

Ejemplo 2: Diseño de variantes del dominio CH3 de Fc de inmunoglobulina para la formación de heterodímeros para cada humano Isotipo de inmunoglobulina (modelado estructural)

Antes de que se construyeran realmente variantes del dominio CH3 para cada isotipo, se predijo si el par de mutaciones A107 podría introducirse de manera estable en las posiciones seleccionadas en el Ejemplo 1 para formar heterodímeros mediante modelado estructural mediante el uso de las secuencias variantes introducidas con cada mutación como se muestra en la Figura 3. El modelado estructural se predijo a través de un servidor de modelado en línea (URL: <https://swissmodel.expasy.org/>; Biasini M y otros, 2014) mediante el uso de una estructura de variante de heterodímero de Fc de inmunoglobulina ya conocida (PDB ID: 4X98) como plantilla. Cada una de las estructuras

obtenidas se superpuso mediante el uso del software Pymol, que podría visualizar las estructuras de proteínas, para observar el cambio estructural del dominio CH3 y la posición de la mutación A107 después de la introducción de la mutación. En la estructura superpuesta, se vio que, incluso cuando la mutación A107 se introdujo en cada isotipo, las estructuras se mantuvieron sin grandes cambios, en comparación con la estructura modelada de variantes A107 convencionales construidas en base a isotipos de IgG1 y que forman heterodímeros de Fc CH3A:CH3B. En particular, se demostró que las direcciones de los residuos de aminoácidos de la mutación A107 introducida fueron casi consistentes y que las distancias para la interacción entre los aminoácidos mutados también se mantuvieron en niveles similares (ver Figura 4).

10 Ejemplo 3: Construcción de variantes de isotipo de Fc heterodimérico A107 para cada isotipo de inmunoglobulina humana

15 Los variantes de tipo Fc heterodimérico A107 diseñadas a través de la secuenciación en el Ejemplo 1 y el modelado estructural en el Ejemplo 2 se clonaron en marco en el vector de expresión celular animal pcDNA3.1(+)(Invitrogen, Estados Unidos) para tener secuencia señal-bisagra-CH2-CH3 mediante el uso de enzimas de restricción NotI/HindIII y oligonucleótidos sintéticos (Macrogen, Corea) mediante un método de mutagénesis dirigida al sitio que realizan los expertos en la técnica (ver Figura 5).

20 En el dominio de bisagra usado, los residuos de cisteína en la región de bisagra superior, aparte de los residuos de cisteína en la región de bisagra central para la formación de heterodímeros, se sustituyeron con residuos de serina para evitar que se produjeran enlaces disulfuro durante la fusión de proteínas. En particular, para IgG3, se encontró en la literatura que las altas funciones efectoras de anticuerpos (ADCC y CDC) de IgG3 se mantienen incluso solo por los 15 aminoácidos C-terminales del dominio de bisagra central entre los 47 aminoácidos del dominio de bisagra del alotipo G3m(s,t) (Dall'Acqua WF y otros, 2006). En consecuencia, solo se usaron los 15 aminoácidos C-terminales de la secuencia mostrada en la Figura 5.

25 La Tabla 2 más abajo muestra la información de secuencia de aminoácidos de las regiones CH3 en los pares de variantes Fc heterodimérico A107 y de tipo silvestre de la presente invención.

30 Tabla 2

configuración	Cadena CH3A (secuencia CH3 de la primera región Fc) (número EU 341 a 447)	Cadena CH3B (secuencia CH3 de la segunda región Fc) (número EU 341 a 447)
IgG1 tipo silvestre	GQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSSLSP GK (SEQ ID NO: 7)	Igual que SEQ ID NO: 7
γ1-A107	GQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVIEGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSWLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSP PGK (SEQ ID NO: 8)	GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQOPENNYKTTPPVLSDGFTL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTOKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)
IgG2 tipo silvestre	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSSLSP GK (SEQ ID NO: 10)	Igual que SEQ ID NO: 10
γ2-A107	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPMLDSDGS FFLYSWLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSP PGK (SEQ ID NO: 11)	GQPREPQVYTLPPSRENMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPMLVSDGFS TLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSSLSPG K (SEQ ID NO: 12)

(continuación)

	configuración	Cadena CH3A (secuencia CH3 de la primera región Fc) (número EU 341 a 447)	Cadena CH3B (secuencia CH3 de la segunda región Fc) (número EU 341 a 447)
5	IgG3 tipo silvestre	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAMEWE SSGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 13)	Igual que SEQ ID NO: 13
10	γ 3-A107	GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAMEWE SSGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSWLTVDKSRWQQGNIFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 14)	GQPREPQVYTLPPSRENMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAMEWES SGQPENNYKTTPPVLVSDGSFT LYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)
15	IgG4 tipo silvestre	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 16)	Igual que SEQ ID NO: 16
20	γ 4-A107	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVEGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSWLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK (SEQ ID NO: 5)	GQPREPQVYTLPPSQENMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFT LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 6)
25			
30			
35			
40			

Ejemplo 4: Evaluación de la capacidad de heterodimerización de variantes de Fc heterodimérico A107 para cada isotipo de inmunoglobulina humana

45 Para examinar si los variantes de isotipo de Fc heterodimérico A107 construidas en el Ejemplo 3 tienen realmente una capacidad de heterodimerización similar a la de las variantes A107 de tipo silvestre, se utilizó un scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} sistema de expresión que se usa principalmente para evaluar la capacidad de heterodimerización de variantes Fc en el mismo tipo de estudios (Choi y otros, 2013). La Figura 6 es una vista esquemática que muestra el sistema de expresión scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B}. Dado que los anticuerpos purificados en el sistema de expresión scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} muestran pesos moleculares diferentes entre un homodímero scFv-Fc_{CH3A} (103 kDa), un heterodímero scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B} (78 kDa) y un homodímero Fc_{CH3B} (53 kDa), el grado de formación del heterodímero puede compararse en SDS-PAGE.

55 Como el Fc_{CH3B} vector, se usó el vector construido en el Ejemplo 3. Adicionalmente, se clonó un vector mediante la introducción de scFv solo en el extremo N-terminal de Fc_{CH3A}, es decir, proporcionar un formato de pcDNA3.1(+)-scFv-bisagra-CH2-CH3A (scFv-Fc_{CH3A}). La Figura 7 es una vista esquemática del vector de expresión de células animales pcDNA3.1(+)-scFv-bisagra-CH2-CH3A (scFv-Fc_{CH3A}) usado en el sistema de expresión scFv-Fc_{CH3A}/Fc_{CH3B}. El anticuerpo scFv usado es un anticuerpo obtenido mediante el enlace de las regiones VH y VL de hAY4a, que es una versión de afinidad mejorada del anticuerpo humanizado hAY4 que se une específicamente a DR4 (Lee, Park y otros 2010). La clonación se realizó mediante el uso de la enzima de restricción NotI y la enzima de restricción BsiWI ubicada inmediatamente antes del dominio de bisagra. Como control para la variante, el Fc de tipo silvestre se construyó en el mismo formato (scFv-Fc/Fc).

60 Ejemplo 5: Expresión y purificación de anticuerpos que comprenden variantes de Fc heterodimérico A107 para cada isotipo de inmunoglobulina humana

65

Coexpresión del scFv-Fc construido_{CH3A} y Fc_{CH3B} se realizó mediante la transfección transitoria de una mezcla de vectores de expresión (relación 1:1) y polietilenimina (PEI) (Polyscience) en células HEK293-F (Invitrogen) y cultivo de las células en un matraz agitador que contenía medio de expresión FreeStyle 293 sin suero. El método detallado es el siguiente.

5 Para la transfección de 200 ml en un matraz agitador (Corning), las células HEK293-F se sembraron en 100 ml de medio a una densidad de $2,0 \times 10^6$ células/ml, y se cultivaron a 150 rpm en 8 % de CO₂. Para producir cada anticuerpo humanizado, se diluyeron plásmidos de cadena pesada y de cadena ligera para cada anticuerpo en 10 ml de medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) en una cantidad total de 250 µg (2,5 µg/ml) (125 µg para la cadena ligera y 10 125 µg para la cadena pesada), y el medio se mezcló con 10 ml de medio (7,5 µg/ml) que contenía 750 µg de PEI diluido en el mismo. La mezcla media se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, la mezcla de medio incubado se añadió a 100 ml de las células sembradas y se incubó durante 4 horas a 150 rpm bajo 8 % CO₂, después de lo cual se añadió a este el medio de expresión FreeStyle 293 restante de 100 ml, seguido de incubación durante 5 a 7 días. Durante esta incubación, la proteína producida por las células, es decir, un anticuerpo que comprende la variante Fc, se secretó fuera de las células y se acumuló en el medio. Por esta razón, la proteína se purificó mediante el uso de la columna de sefarosa de proteína A (GE Healthcare) a partir del sobrenadante de cultivo celular recogido por 20 minutos de centrifugación a 2500 rpm después del cultivo celular. En este caso, el proceso de purificación se realizó con referencia al protocolo estándar proporcionado por la compañía de la columna de proteína A. La proteína purificada se cuantificó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm mediante el uso de la solución en el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo) y la determinación de la cantidad de esta de acuerdo con la curva estándar preparada.

Ejemplo 6: Evaluación de la capacidad de heterodimerización de variantes de Fc heterodimérico A107 para cada isotipo de inmunoglobulina humana

25 5 µg del anticuerpo, purificado en el Ejemplo 5 y que comprende la variante de Fc heterodimérico A107 para cada isotipo, se analizó en SDS-PAGE al 12 % en condiciones no reductoras (Figura 8). Se observó un homodímero de la variante CH3A a 103 KD; se observó un homodímero de la variante CH3B a 53KD; se observó un monómero de la variante CH3B a 25 kD; y se observó un heterodímero de la variante CH3A y la variante CH3B a 78 kD. Para examinar con mayor precisión el grado de homodimerización, también se realizó la transferencia Western. La transferencia Western se realizó mediante el aislamiento de 0,1 µg de proteína, que fue menor que en el análisis de SDS-PAGE al 12 %, en condiciones no reductoras, y después tratar la proteína con anticuerpo conjugado con IgG anti-humana-AP (Sigma) de acuerdo con un método convencional conocido en la técnica (Figura 9).

35 Como puede verse en las Figuras 8 y 9, para los heterodímeros de IgG1 introducidos con el dominio CH3 de tipo silvestre que es un control, se observaron todos en SDS-PAGE, un homodímero de cada uno de CH3A y CH3B y un heterodímero CH3A:CH3B, mientras que las variantes de Fc heterodimérico A107 para cada tipo de inmunoglobulina humana, obtenidas mediante la introducción de la mutación de heterodimerización A107 en IgG2, IgG3 e IgG4, excepto IgG1, formaron heterodímeros en rendimientos similares o superiores a los de las variantes A107 basadas en IgG1 informadas previamente. En este momento, para la variante de IgG4, también se observó un monómero de Fc (Fc medio) que comprende CH3A o CH3B, que es una de las propiedades de IgG4 de origen natural y resulta de la propiedad de formar Fc medio con respecto al dominio de bisagra (particularmente, serina en la posición 228 en la región de bisagra central) antes de la aparición del intercambio de brazos Fab en sangre (Liu H y otros, 2012).

40 45 Ejemplo 7: Construcción de la proteína de fusión de IL-12 humana/murina

50 Se encontró que las variantes de isotipo en los Ejemplos 1 a 6 retienen su capacidad de heterodimerización a un nivel similar al de la variante de Fc heterodimérico A107 basada en IgG1 informada previamente. Entre estas variantes de isotipo, la variante basada en IgG4 ($\gamma 4\text{-}A107$) se usó para construir una proteína de fusión de IL-12 de larga duración. La IL-12 de origen natural se compone de dos subunidades, una subunidad p35 (p35; IL-12A) y una subunidad p40 (p40; IL-12B), y las dos subunidades interactúan para formar un heterodímero que tiene actividad. La formación de este heterodímero se logra porque las dos subunidades se acoplan más fuerte y establemente mediante un solo enlace disulfuro presente entre las dos subunidades. En consecuencia, las dos subunidades (p35 y p40) de IL12 se fusionaron genéticamente al extremo N-terminal de cada cadena de Fc heterodimérico para mantener la forma heterodimérica de la citocina de origen natural.

55 Como variante de Fc heterodimérico para la construcción de una proteína de fusión, se usó 4-A107, que se basó en IgG4 y formaría un heterodímero mediante la introducción de la mutación A107. Como se informó anteriormente, en la construcción de una inmunocitocina que es una fusión de un anticuerpo y una citocina, la función efectora del anticuerpo (tal como ADCC/CDC) de IgG1 promueve más aclaramiento *in vivo*. Por esta razón, se construyó una proteína de fusión mediante el uso de un isotipo de IgG4 que apenas muestra la función ADCC/CDC, en comparación con IgG1 (Gillies SD y otros, 1999).

60 65 La Figura 10 muestra vistas esquemáticas de una proteína recombinante de IL-12, una proteína de fusión de IL-12 monovalente (mono-IL-12-Fc) obtenida mediante el uso de $\gamma 4\text{-}A107$, y una proteína de fusión de IL-12 bivalente (bi-

IL-12-Fc) obtenida mediante el uso de Fc de tipo silvestre en la presente invención. En particular, la Figura 10(C) muestra una proteína de fusión construida mediante la introducción del par de variantes CH3 en la presente invención. La secuencia de ADN de cada una de la IL-12 humana (hIL-12, nombre de entrada de Uniprot P29460, P29459; SEQ ID NO: 17-18) y la IL-12 de ratón (mIL-12, nombre de entrada de Uniprot P43432, P43431; SEQ ID NO: 19-20), que codifica una forma madura que excluye una secuencia señal, se amplificó, y cada producto de amplificación se clonó en marco en un vector de expresión celular animal que contenía la variante γ 4-A107 mediante el uso de enzimas de restricción NotI/BsiWI como se muestra en las Figuras 11(A) y 11(B). Las proteínas resultantes se denominaron mono-hIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc, respectivamente. En particular, se añadió un enlazador peptídico flexible que consiste de 15 aminoácidos entre la subunidad p35 y el dominio de bisagra de manera que la subunidad p35 humana/murina pudiera interactuar suficientemente con la subunidad p40 (enlazador (G₄S)₃ flexible). Como ejemplos comparativos para la proteína mostrada en la Figura 10(C), se construyeron bi-hIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc mediante la fusión de cada uno de IL-12 humano (hIL-12) e IL-12 de ratón (mIL-12) con Fc de IgG4 de tipo silvestre (IgG4 wt). Para fusionar un solo Fc con IL-12 que tiene actividad solo en una forma heterodimérica, las dos subunidades de IL-12 se unieron entre sí mediante el enlazador peptídico de 15 aminoácidos, y después se clonaron en marco en un vector de expresión celular animal que contenía la variante γ 4-A107 mediante el uso de enzimas de restricción NotI/BsiWI como se muestra en la Figura 12. Los ejemplos comparativos son proteínas de fusión usadas en estudios anteriores para fabricar proteínas de fusión de IL-12 (Lisan S. Peng y otros, 1999).

La Tabla 3 más abajo muestra las secuencias de aminoácidos para una forma madura de las subunidades de las IL-12 humana y de ratón usadas para la construcción de las proteínas de fusión.

Tabla 3

configuración	Cadena CH3A (subunidad p40)	Cadena CH3B (subunidad p35)
IL-12 humano maduro	IWELKKDVYVVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWT LDQSSEVLGSGKTLTIQVKKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKE PKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAE ESLPIEVMDAVHKLKYENY TSSFFIRDHKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTP HSYFSLTECVQVQGKSREK KDRVFTDKTSATVICRKNAI SVRAQDRYYSSSWSEWASVP CS (SEQ ID NO: 17)	RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLI RAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 18)

55

60

65

(continuación)

configuración	Cadena CH3A (subunidad p40)	Cadena CH3B (subunidad p35)
5	MWELEKD VYVVEVDWTPD APGETVNLTCDTPEEDDITW TSDQRHG VIGSGKTLTIVKE FLDAGQYT CHKGGETLSHSH LLLHKKK ENGIWSTEILKNFKN KTFLKCEAP NYSGRFTCSWL VQRNMDL KENIKSSSSSPDSR AVTCGMASL SAEKVTLDQR DYEKYSVSC QEDVTCPTARE TLPIELALEARQQNKYENYST SFFIRDI HKPDPPKNIQMKPLK NSQVEVSWEY PDSWSTPHSY FSLKFFVRI QRKKEKMKETEE GCNQKGAF LVEKTSTEVQCK GGNVCVQ AQDRYYNSSCSK WACVPCRVR (SEQ ID NO: 19)	RVIPVSGPARCLS QSRNLKTTD DMVKTAREKL KHYSCTAEDIDH EDITRDQT STLKTCLPLEUHNES CLATRETSS TRGSCLPPQKTS MMTLCLGSI YEDLKMYQTEFQA INAALQNHNHQ QIILDKGMLVAI DELMQSLNHNG ETLRQKPPVGE ADPYRV KMKLCILLHAESTRVV TINRVMGYLSSA (SEQ ID NO: 20)
10		
15		
20	IL-12 de ratón maduro	
25		
30		
35		

Ejemplo 8: Expresión/purificación de proteína de fusión de IL-12

40 La proteína de fusión mono-IL-12-Fc en la Figura 10(C) se expresó/purificó a partir de los vectores de expresión IE-12.p40-γ4-A107A humano/rata y ZL-12.p35-γ4-A107B humano/murino (relación 1: 1) de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5. La proteína de fusión bi-IL-12-Fc en la Figura 10(B) se expresó/purificó a través de la transfección única del vector de expresión de Fc(wt) de scIL-12-IgG4 humano/rata. Todas las proteínas de fusión se expresaron/purificaron en una cantidad de 12 a 13 mg por 100 ml del cultivo celular HEK293F.

45 5 μSe analizó la g de cada una de las proteínas de fusión mono-IL-12-Fc y bi-IL-12-Fc purificadas en SDS-PAGE al 12 % en condiciones no reductoras (Figura 13). Se observó un monómero de la variante de IL-12.p40-CH3A a 60 kD; se observó un homodímero de la variante de IL-12.p40-CH3A a 120 kD; se observó un monómero de la variante de IL-12.p35-CH3B a 50 kD; se observó un homodímero de la variante de IL-12.p35-CH3B a 100 kD; y se observó un heterodímero de la variante de IL-12.p40-CH3A y la variante de IL-12.p35-CH3B a 110 kD. Sin embargo, para las proteínas obtenidas mediante el enlace de las subunidades de interleucina humana y de rata, se observaron bandas de tamaños ligeramente diferentes, y se encontró en la literatura que estas bandas resultan de diferentes patrones de glucosilación (Lo y otros, 2007). Además, de la misma manera como se describió en el Ejemplo 6 anterior, se observó un monómero en todas las proteínas de fusión de IL-12 en base a IgG4. De manera similar al informe anterior de que la subunidad p35 no se expresa naturalmente en una forma monomérica sin la ayuda de la subunidad p40, solo se observó un monómero de CH3A enlazado a la subunidad p40 en la proteína de fusión mono-IL-12-Fc obtenida mediante el uso de la variante de Fc heterodimérico (Gillies y otros, 1998b).

60 La Figura 14 muestra los resultados del análisis de las proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se observó parcialmente un oligómero de la proteína de fusión Mono-hIL-12-Fc.

Ejemplo 9: Evaluación de la afinidad de unión de la proteína de fusión mono-hIL-12-Fc por el receptor de IL-12

65 La afinidad de unión del mono-hIL-12-Fc, expresado y purificado en el Ejemplo 8, por el receptor de IL-12, se analizó comparativamente con la de bi-hIL-12-Fc.

La Figura 15 muestra los resultados del análisis FACS-Calibur (BD Biosciences) realizado para determinar que la hIL-12-Fc monomérica construida mostraría afinidad de unión por el receptor de IL-12, en comparación con la bi-hIL-12-Fc.

- 5 Específicamente, para aislar células inmunitarias (PBMC) de sangre periférica humana, se rellenaron 5 ml de Ficoll (GE Healthcare) en un tubo de ensayo de 15 ml. La sangre muestreada se mezcló con PBS (pH 7,4) en 1:1 y se agitó, y después se tomaron 10 ml de la sangre y se centrifugaron en el tubo de ensayo que contenía Ficoll en un estado de "sin rotura" a 750 g durante 20 minutos para no mezclar con Ficoll. A continuación, se recuperó la capa de leucocitos formada en el Ficoll y se lavó dos veces con PBS (pH 7,4), y después se obtuvieron PBMC, que incluyen células T, células B, células NK y monocitos. Las PBMC normales aisladas no expresaron IL-12R en cantidades tan grandes que pudiera observarse la unión de IL-12. Por esta razón, las células se estimularon mediante tratamiento con el mitógeno PHA (Sigma-Aldrich) durante 72 horas para que las células T y las células NK pudieran activarse. Se informó que cuando las células se tratan con PHA, el receptor de IL-12 se expresa en células T y células NK mientras las células inmunitarias se dividen. Se añadieron PBMC a medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % a una densidad de 1 X 10⁶ células/ml, y el mitógeno PHA se añadió a una concentración de 10 µg/ml, después de lo cual las células se cultivaron en incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C durante 72 horas. Las PBMC normales y las PBMC activadas por PHA se lavaron con PBS frío (pH 7,4) y 5 X 10⁵ células por muestra se prepararon. Cada uno de Fc (A107), bi-hIL-12-Fc y mono-hIL-12-Fc se añadió a cada muestra a una concentración de 1 µM, se incubó a 4 °C durante 30 minutos, y después se lavó con PBS frío (pH 7,4). Cada muestra se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG4 humano conjugado con FITC (Sigma-Aldrich) a 4 °C durante 30 minutos, se lavó con PBS (pH 7,4) y después se analizó mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience). Después del análisis, se obtuvo un gráfico de histograma para cada muestra y se evaluó la afinidad de unión de mono-hIL-12-Fc por el receptor de IL-12.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Los resultados del análisis indicaron que bi-hIL-12-Fc y mono-hIL-12-Fc no se unieron a PBMC normales que no expresan receptor de IL-12 y solo se unieron a PBMC activadas por PHA que expresan receptor de IL-12. Por lo tanto, se descubrió que la afinidad de unión de mono-hIL-12-Fc por el receptor de IL-12 era igual a la de bi-hIL-12-Fc.

Ejemplo 10: Evaluación de la capacidad de la proteína de fusión mono-hIL-12-Fc para inducir la proliferación de PBMC

- Se examinó si el resto de IL-12 en la proteína de fusión de IL-12 retendría una actividad fisiológica comparable a la de la IL-12 recombinante real (rIL-12) mediante su unión al receptor de IL-12 mediante el uso de IL-12 humana recombinante (rhIL-12, Thermo Fisher Scientific) como control.

- La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular WST-1 realizado para examinar las capacidades de proliferación celular de Fc (A107), rhIL-12, bi-hIL-12-Fc y mono-hIL-12-Fc en PBMC activadas por PHA.

- Específicamente, las PBMC (2 X 10⁴ células, 50 µl) activados por PHA de la misma manera como se describió en el Ejemplo 9 se añadieron a una placa de 96 pocillos (SPL, Corea), seguido de la adición de 50 µl de cada uno de 50-0,4 pM de Fc (A107), rhIL-12, bi-hIL-12-Fc y mono-hIL-12-Fc diluido en serie con medio RPMI1640 que contiene FBS al 10 %. A continuación, las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 72 horas. Para un ensayo de proliferación celular, después, se añadió 10 µl de reactivo WST-1 (sales de tetrazolio solubles en agua, Sigma-aldrich) a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 4 horas, y se midió la absorbancia a 570 nm mediante el uso de un lector de microplacas (Molecular Devices).

- Como resultado, se demostró que el mono-hIL-12-Fc tenía una capacidad de proliferación de PBMC similar o superior a la de rhIL-12.

- Ejemplo 11: Evaluación de la capacidad de la proteína de fusión mono-hIL-12-Fc para inducir secreción de IFNγ de PBMC

- La Figura 17 muestra los resultados de un ELISA realizado para medir la cantidad de IFN-γ secretado de PBMC activadas por PHA por Fc (A107), rhIL-12, bi-hIL-12-Fc y mono-hIL-12-Fc.

- Específicamente, para medir la concentración de IFN-γ en el sobrenadante de cultivo cultivado durante 72 horas en el Ejemplo 10, una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Corea) para ELISA se recubrió con anticuerpo de captura de IFN-γ (Thermo Fisher Scientific) durante 12 horas, se lavó con PBST y después se bloqueó con BSA al 1 % (PBS con albúmina sérica al 1 %) a temperatura ambiente durante 1 hora. Despues de lavar con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), el sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 2 se diluyó 5 veces con BSA al 1 % y 100 µl de la dilución se añadió a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Despues del lavado con PBST, cada pocillo se incubó con anticuerpo de detección de IFN-γ conjugado con biotina (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 1 hora. Despues de lavar con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), cada pocillo se incubó con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavó con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %) y despues se trató con

sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, sigma-aldrich). La absorbancia a 405 nm se midió mediante el uso de un lector de microplacas.

Como resultado, se demostró que la capacidad de mono-hIL-12-Fc para inducir la secreción de IFN- γ de PBMC fue similar o mayor que la de rhIL-12.

Ejemplo de referencia 12: Evaluación de la afinidad de unión de mono-mIL-12-Fc por el receptor de IL-12

La afinidad de unión de mono-mIL-12-Fc, expresada/purificada en el Ejemplo 8, por el receptor de IL-12, se analizó comparativamente con la de bi-mIL-12-Fc.

La Figura 18 muestra los resultados de la citometría de flujo realizada para determinar que la mono-mIL-12-Fc construida muestra una afinidad de unión por el receptor de IL-12, en comparación con bi-mIL-12-Fc.

Específicamente, se informó que la IL-12 de ratón se une no solo al receptor de IL-12 de ratón, sino también al receptor de IL-12 humano. Por lo tanto, el análisis se realizó de la misma manera como se describió en el Ejemplo 9. Los resultados del análisis indicaron que bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc no se unieron a PBMC normales que no expresan receptor de IL-12 y solo se unieron a PBMC activadas por PHA que expresan receptor de IL-12. Por lo tanto, se demostró que la afinidad de unión de mono-mIL-12-Fc por el receptor de IL-12 era la misma que la de bi-mIL-12-Fc.

Ejemplo de referencia 13: Evaluación de la capacidad de mono-mIL-12-Fc para inducir la proliferación de PBMC

La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular WST-1 realizado para examinar los efectos de las capacidades de Fc (A107), IL-12 recombinante de ratón (rmIL-12), bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc sobre la proliferación celular de PBMC activadas por PHA.

Específicamente, las PBMC (2×10^4 células, 50 ml) activadas por PHA de la misma manera como se describió en el Ejemplo 9 se añadieron a una placa de 96 pocillos, seguido de la adición de 50 μ l de cada uno de 50-0,4 pM de Fc (A107), rmIL-12, bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc diluido en serie con medio RPMI1640 que contiene FBS al 10 %. A continuación, las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 72 horas, y después se realizó un ensayo WST de la misma manera como se describió en el Ejemplo 10. Como resultado, se demostró que mono-mIL-12-Fc tenía la capacidad de inducir la proliferación de PBMC, similar a la rmIL-12.

Ejemplo de referencia 14: Evaluación de la capacidad de mono-mIL-12-Fc para inhibir *In Vivo* Crecimiento tumoral

En el Ejemplo 13, se evaluó la capacidad de mono-mIL-12-Fc para inducir la proliferación de PBMC activadas por PHA. Se examinó si el mismo efecto de mono-mIL-12-Fc también aparecería *in vivo*.

Las Figuras 20(A) y 20(B) muestran los resultados de la medición de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de mono-mIL-12-Fc en 100 mm³ tumores en ratones vivos.

Específicamente, se afeitaron ratones Balb/c hembras de 4 semanas de edad (NARA Biotech, Corea) y se trasplantaron células de cáncer colorrectal CT26^{HER2/Neu} (1×10^6 células/ratón) diluidas en 150 μ l de PBS por vía subcutánea a los ratones. Los ratones que tienen volúmenes tumorales similares (volumen promedio: 100 a 120 mm³) se agruparon aleatoriamente, y cada uno de Fc (A107), rmIL-12 (Thermo Fisher Scientific), bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc se inyectó intraperitonealmente un total de seis veces (dos veces a la semana) en cada ratón a la dosis correspondiente a una cantidad molar equivalente de 1 μ g de IL-12. El tumor se midió dos veces a la semana y el volumen tumoral (V) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación: V=longitud X ancho²/2.

Como se muestra en la Figura 20(A), en comparación con el control, la administración de 1 μ g de rmIL-12 no tuvo efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral, pero las concentraciones equimolares de mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc inhibieron el crecimiento tumoral. Además, como se muestra en la Figura 20(B), la administración de mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc mostró pocos o ningún cambio en el peso corporal de los ratones en comparación con el control, lo que indica que mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc no son tóxicas.

Las Figuras 21(A), 21(B) y 21(C) muestran los resultados de la medición de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de varias concentraciones de mono-mIL-12-Fc en 300 mm³ tumores en ratones vivos.

Específicamente, se afeitaron ratones Balb/c hembras de 4 semanas de edad (NARA Biotech, Corea) y se trasplantaron células de cáncer colorrectal CT26^{HER2/Neu} (1×10^6 células/ratón) diluidas en 150 μ l de PBS por vía subcutánea a los ratones. Los ratones que tienen volúmenes tumorales similares (volumen promedio: 300 mm³) se agruparon aleatoriamente, y cada una de bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc se inyectó intraperitonealmente un total de 6 veces (dos veces a la semana) en cada ratón a una concentración equimolar de 0,1-2 μ g de rmIL-12. El tumor se midió dos veces a la semana y el volumen tumoral (V) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación: V=longitud X ancho²/2.

Como se muestra en las Figuras 21(A), 21(B) y 21(C), a una dosis correspondiente a una cantidad molar equivalente de 1 µg de IL-12 o menos, mono-mIL-12-Fc mostró un alto efecto de inhibición del crecimiento de tumores grandes, en comparación con bi-IL-12-Fc. A una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 0,25 µg de IL-12, bi-mIL-12-Fc mostró el efecto de inhibir el crecimiento tumoral, pero no eliminó el tumor. Sin embargo, bajo el régimen de dosificación idéntico, el mono-mIL-12-Fc mostró el efecto de eliminar el tumor en el 40 % de los ratones. Además, a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 0,5 µg de IL-12 en el que bi-mIL-12-Fc falló en eliminar el tumor, mono-mIL-12-Fc eliminó el tumor en el 73 % de los ratones incluso cuando se administró solo cinco veces.

10 Ejemplo de referencia 15; Evaluación de la toxicidad *in vivo* de mono-mIL-12-Fc

La Figura 21(D) muestra los resultados de la medición de los cambios de peso corporal para determinar la toxicidad *in vivo* de mono-mIL-12-Fc administrada a varias concentraciones.

15 Específicamente, como se muestra en la Figura 21(A), se observó si el peso corporal se reduciría al medir el peso corporal de ratones, administrados con mono-mIL-12-Fc, dos veces a la semana. Se demostró que el aumento del peso corporal se produjo a medida que aumentaba el volumen tumoral en el grupo de control, pero los ratones administrados con todas las concentraciones de bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc no mostraron disminución del peso corporal en comparación con antes de la administración. Por lo tanto, se determinó que mono-mIL-12-Fc no induce una reducción en el peso corporal y, por lo tanto, no tiene un efecto significativo *in vivo* toxicidad.

20 La Figura 21(D) muestra los resultados de la medición de la alanina aminotransferasa (ALT) que es un marcador de hepatotoxicidad.

25 Específicamente, se tomaron muestras de sangre de las venas faciales de los ratones de la Figura 21(A) a las 24 horas después de la última administración. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas para inducir la coagulación de la sangre y después se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y se recogió el suero sobrenadante. Para medir la concentración de ALT en suero, se tomaron muestras de sangre de las venas faciales del ratón 24 horas después de la última administración de la proteína de fusión IL-12-Fc. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas para inducir la coagulación de la sangre y después se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y se recogió el suero sobrenadante. Para medir la concentración de ALT en el suero, se tomó una solución de sustrato para la medición de ALT (una mezcla de alanina y α-cetoglutarato) en un tubo de ensayo de 15 ml y se incubó en un baño de agua a temperatura constante a 37 °C durante 5 minutos. El suero aislado de la sangre de ratones trasplantados con tumor administrados con cada una de bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc se diluyó 10 veces, 30 y se añadieron 200 µl de la dilución a la solución de sustrato, se agitó y se incubó en un baño de agua a temperatura constante a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió 1 ml de un reactivo de desarrollo de color (2,4-dinitrofenil-1-hidrazona) al tubo de ensayo sacado del baño de agua a temperatura constante, y el tubo de ensayo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 10 ml de solución de hidróxido de sodio 0,4 N al tubo de ensayo y se mezclaron, y después el tubo de ensayo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia a 505 nm se midió mediante el uso de un espectrofotómetro fotoeléctrico (GeneQuant100, GE Healthcare). Mediante el uso de una curva estándar preparada mediante la adición de un reactivo de curva estándar en lugar de suero, la ALT se convirtió en unidades. Se demostró que el suero de la sangre muestreada de ratones administrados con Bi-mIL-12-Fc o mono-mIL-12-Fc mostró actividad de ALT similar a la del suero separado de la muestra de sangre de los ratones Balb/c de control o normales. Esto sugiere que cuando se administra bi-mIL-12-Fc o mono-mIL-12-Fc a ratones trasplantados con tumor a una concentración equimolar a 0,5 µg o 1 µg de IL-12, no induce hepatotoxicidad.

40 Ejemplo de referencia 16: Evaluación de la capacidad de mono-mIL-12-Fc para inducir la proliferación de células inmunitarias *In vivo*

50 Como se muestra en el Ejemplo 15, cuando se administraron bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 2 µg de IL-12, bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc eliminaron todos el tumor, pero cuando se administraron a una concentración molar inferior a 1 µg de IL-12, el efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de mono-mIL-12-Fc fue significativamente mayor que el de bi-mIL-12-Fc. De hecho, se realizó un análisis para determinar si el alto efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de mono-mIL-12-Fc se asociaría con un aumento en el número de células efectoras intrínsecas tales como células NK, células T CD4⁺ y células T CD8⁺, que tienen el receptor de IL-12.

60 La Figura 22(A) muestra los resultados de la medición de los aumentos en el número de células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK en el bazo de ratones sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A).

65 Específicamente, después del tratamiento como se muestra en la Figura 21(A), el bazo de ratón se diseccionó 34 días después del trasplante de tumor, se trituró mediante el uso de una malla amplia en una placa de Petri y después se lavó con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lisar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS para preparar una suspensión de

células del bazo, y el número de células se contó con un hemocitómetro. Se añadieron anticuerpos anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD49b conjugados con APC, FITC, PE o PE-cy5 a los linfocitos del bazo que después se tiñeron a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS frío (pH 7,4) y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) y Flow jo (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos, y la población celular CD45⁺CD3⁺CD4⁺, la población celular CD45⁺CD3⁺CD8⁺ y la población celular CD45⁺CD3⁻CD49b⁺ se definieron como células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK, respectivamente, y las proporciones de estas con relación al total de células del bazo se calcularon y se multiplicaron por el número de células contadas con un hemocitómetro, y se analizó el número de células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK que aumentó después de la administración de mono-mIL-12-Fc.

Como resultado, se pudo ver que, en comparación con el control, mono-mIL-12-Fc aumentó el número de células T CD4⁺ y células T CD8⁺ en los ratones trasplantados con tumor de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, bi-mIL-12-Fc aumentó el número de células T CD8⁺ solo en el grupo administrado con la misma concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 0,5 µg de IL-12, y no aumentó el número de células T CD4⁺ y células T CD8⁺ en el grupo administrado con la misma concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 1 µg de IL-12. De acuerdo con los resultados del estudio anterior (Cerwenka y Lanier, 2016; Schreiber y otros, 2011) que las células NK no forman células de memoria en ratones trasplantados con tumor, se observó que 34 días después del trasplante de tumor, el número de células NK en los grupos administrados con mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc fue similar al del grupo de control. Como resultado, se demostró que mono-mIL-12-Fc provocó una mayor expansión de células T CD4⁺ y células T CD8⁺, que representan la mayor inhibición del crecimiento tumoral, en comparación con bi-mIL12-Fc.

En base al informe (Schreiber y otros, 2011) de que un aumento en el número de células inmunitarias adaptativas (células T CD4⁺ y células T CD8⁺) que se infiltraron en los tumores es importante para inhibir el crecimiento tumoral, se analizó si mono-mIL-12-Fc aumentaría el número de células inmunitarias adaptativas que se infiltraron en los tumores. Cuando se administró mono-mIL-12-Fc 6 veces, hubo muchos ratones que no tenían tumor. Por esta razón, se administró mono-mIL-12-Fc 3 veces y después se analizó el número de células inmunitarias que se infiltraron en el tumor de ratón.

La Figura 22(B) muestra los resultados de la medición del número de células inmunitarias totales, células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que se infiltraron en el tumor en los ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A).

Específicamente, después del tratamiento como se muestra en la Figura 21(A), el tumor de ratón se diseccionó 24 días después del trasplante de tumor y se pesó. Despues, el tumor se trituró mediante el uso de una malla de alambre y colagenasa (100 µml) en una placa de Petri y se centrifugó en 10 ml de medio que contenía FBS al 2 % a 50 g durante 5 minutos para eliminar el tejido parenquimatoso. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lisar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS para preparar una suspensión celular, y el número de células se contó con un hemocitómetro. Se añadieron anticuerpos anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 conjugados con APC, FITC o PE-cy5 a las células aisladas de tumor que después se tiñeron a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS frío (pH 7,4) y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) y Flow jo (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos y después la población celular CD45⁺, la población celular CD45⁺CD3⁺CD4⁺ y la población celular CD45⁺CD3⁺CD8⁺ y la población celular CD45⁺CD3⁻CD49b⁺ se definieron como el total de células inmunitarias infiltrantes en el tumor, células T CD4⁺ infiltrantes en el tumor y células T CD8⁺ infiltrantes en el tumor, respectivamente. Las proporciones de estas células con relación a las células aisladas del tumor completo se calcularon y se multiplicaron por el número de células contadas con un hemocitómetro, y después se analizó el número total de células inmunitarias infiltrantes en el tumor, células T CD4⁺ infiltrantes en el tumor y células T CD8⁺ infiltrantes en el tumor que aumentó después de la administración de mono-mIL-12-Fc.

Como resultado, se pudo ver que, en comparación con el control, bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc aumentaron de forma dependiente de la concentración el número de células inmunitarias totales, células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que infiltraron el tumor. A la concentración equimolar, mono-mIL-12-Fc aumentó significativamente las células inmunitarias totales, células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que infiltraron el tumor, en comparación con bi-mIL-12-Fc. Como resultado, se demostró que mono-mIL-12-Fc provocó una mayor infiltración de células T CD4⁺ y células T CD8⁺ en el tumor, que explican la mayor inhibición del crecimiento tumoral, en comparación con bi-mIL12-Fc.

Ejemplo de referencia 17: Evaluación de los efectos de mono-mIL-12-Fc sobre la secreción de citocinas de células inmunitarias *In Vivo* y aumento de la citotoxicidad

Se conoce que la IL-12 inhibe el crecimiento de las células cancerosas al aumentar la secreción de IFN-γ de células T y células NK (Trinchieri, 2003). Además, la IL-12 exhibe efectos anticancerígenos mediante el aumento de los efectos citotóxicos directos de las células T citotóxicas y las células asesinas naturales contra las células cancerosas. Por lo tanto, se realizó un análisis para determinar si el alto efecto anticanceroso de mono-IL-12-Fc sería atribuible a un

5
10

15
20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

aumento en la concentración de IFN- γ sérico de ratones trasplantados con tumor y al aumento del efecto citotóxico directo de las células T citotóxicas y las células asesinas naturales contra las células cancerosas.

5 La Figura 23(A) muestra los resultados de un ELISA realizado para medir la concentración de IFN- γ en el suero separado de la sangre muestreada de venas faciales de ratón a las 24 horas después de la última administración en la Figura 21(A).

10 Específicamente, a las 24 horas después de la última administración de la proteína de fusión mIL-12-Fc en la Figura 20(A), se tomó una muestra de sangre de las venas faciales de los ratones. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas para inducir la coagulación de la sangre y después se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y se recogió el suero sobrenadante. Para medir la concentración de IFN- γ en el suero, una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) para ELISA se recubrió con IFN- γ anticuerpo de captura durante 12 horas, se lavó con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %) y después se bloqueó con BSA al 1 % (PBS con albúmina sérica bovina al 1 %) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), el suero se diluyó 10 veces con BSA al 1 % y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del lavado con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), cada pocillo se incubó con anticuerpo de detección de IFN- γ de ratón conjugado con biotina (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), cada pocillo se incubó con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavó con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %) y después se trató con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, sigma-aldrich). La absorbancia a 450 nm se midió mediante el uso de un lector de microplacas. Como se muestra en la Figura 23(A), la concentración de IFN- γ sérico de los ratones administrados con bi-mIL-12-Fc no aumentó en comparación con la del grupo de control. Sin embargo, se observó que los niveles de IFN- γ sérico aumentaron en los ratones que recibieron el tratamiento con mono-mIL12-Fc en proporción a la dosis hasta una cantidad molar equivalente de 1 mg de rmlL12 en comparación con la del grupo de control. Además, se demostró que el efecto inhibitorio de la formación tumoral de mono-mIL-12-Fc se debió a que mono-mIL-12-Fc aumentó la secreción de IFN- γ se conoce que tiene el efecto de inhibir la proliferación de algunas células cancerosas.

30 En los ratones trasplantados con tumor tratados con bi-mIL12-Fc, los niveles séricos de IFN- γ fueron bajos (Figura 23(A)). Por lo tanto, para determinar si bi-mIL-12-Fc tenía una capacidad baja para inducir la secreción de IFN- γ de células NK y células T, se midió la concentración de IFN- γ sérico en los puntos de tiempo indicados después de la administración única de mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc.

35 La Figura 23(B) muestra los resultados de un ELISA realizado para medir la concentración de IFN- γ en suero en varios puntos de tiempo indicados después de la administración intraperitoneal única de bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc a ratones Balb/c trasplantados con células de cáncer colorrectal CT26^{HER2/Neu}.

40 Específicamente, cuando el volumen tumoral en los ratones Balb/c trasplantados con células de cáncer colorrectal CT26^{HER2/Neu} alcanzaron 300 mm³, bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc se administraron por vía intraperitoneal a una concentración equimolar a 1 μ g de rmlL-12. Después de 1, 3 y 5 días, se tomaron muestras de sangre de las venas faciales de los ratones. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas para inducir la coagulación de la sangre y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el suero sobrenadante. Para medir la concentración de IFN- γ en el suero, una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) para ELISA se recubrió con IFN- γ anticuerpo de captura durante 12 horas, se lavó con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %) y después se bloqueó con BSA al 1 % (PBS con albúmina sérica bovina al 1 %) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), el suero se diluyó 10 veces con BSA al 1 % y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del lavado con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), cada pocillo se incubó con anticuerpo de detección de IFN- γ de ratón conjugado con biotina (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %), cada pocillo se incubó con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavó con PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %) y después se trató con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, sigma-aldrich). La absorbancia a 450 nm se midió mediante el uso de un lector de microplacas. Como se muestra en la Figura 23(B), en los ratones trasplantados con tumor, el grupo que recibió bi-mIL-12-Fc mostró una concentración de IFN- γ sérico similar a la del grupo mono-mIL-12-Fc hasta 5 días, lo que sugiere que bi-mIL-12-Fc no tiene un defecto intrínseco en la capacidad para la secreción de IFN- γ de células efectoras.

60 La Figura 23(C) es un gráfico que muestra los resultados de la medición del efecto citotóxico de células T citotóxicas, aisladas del bazo de ratones sacrificados 3 días después de la última administración en la Figura 21(A), contra células cancerosas CT26^{HER2/Neu}.

65 Específicamente, 72 horas después de la última administración de la citocina en la Figura 21(A), los ratones se sacrificaron, y el bazo se diseccionó a partir de él y se trituró en un plato de 60 mm que contenía una malla de 70 micras y PBS. A las células obtenidas mediante centrifugación, se añadió tampón de lisis de glóbulos rojos para lisar los glóbulos rojos. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo anti-CD3 conjugado con APC (Thermo Fisher Scientific) y anticuerpo anti-CD8 conjugado con PE a 4 °C durante 30 minutos. Después de

que las células se lavaron con PBS, las células T citotóxicas ($CD3^+CD8^+$) se aislaron mediante el uso de FACS Aria III (BD biosciences, Corea). Para medir el efecto citotóxico de las células T citotóxicas contra las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} dianas, las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} se tiñeron con calceína AM (Thermo Fisher Scientific Inc., 10 mM). Las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} (2×10^6) se suspendieron en 2 ml de DPBS y se mezclaron con 2 ml de calceína AM (10 mM) y después se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 45 minutos. Después de lavar con 10 ml de RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, las células se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células por pocillo, y células T citotóxicas ($1 \times 10^5/100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 4 horas. Las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} vivas que mostraron fluorescencia verde y las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} muertas que no mostraron fluorescencia verde se analizaron mediante citometría de flujo, y el efecto citotóxico de las células T citotóxicas se expresó como porcentaje. Se demostró que las células T citotóxicas aisladas de los ratones trasplantados con tumor administrados con mono-mIL-12-Fc mostraron un efecto citotóxico más alto contra las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} dianas en comparación con las células T citotóxicas aisladas de los ratones trasplantados con tumor administrados con bi-mIL-12-Fc o las células T citotóxicas aisladas del grupo de control. Además, se demostró que el efecto inhibidor de la formación tumoral de mono-mIL-12-Fc se atribuyó al efecto citotóxico directo de algunas células T citotóxicas contra células cancerosas.

La Figura 23(D) muestra los resultados de la medición del efecto citotóxico de células T citotóxicas, aisladas del bazo de ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A), mediante el uso de células cancerosas CT26^{HER2/Neu} que expresan antígeno tumoral y células 4T1 que no expresan antígeno tumoral, para determinar si el efecto citotóxico de las células T citotóxicas que se mejoró mediante la administración de mono-IL-12-Fc a los ratones trasplantados con tumor sería específico del antígeno tumoral.

Específicamente, 72 horas después de la tercera administración de mono-IL-12-Fc en la Figura 20(A), los ratones se sacrificaron, y el bazo se diseccionó a partir de él y se trituró en un plato de 60 mm que contenía una malla de 70 micras y PBS. Para medir el efecto citotóxico de las células T citotóxicas contra células cancerosas CT26^{HER2/Neu} dianas y células 4T1 no dianas, las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} y las células cancerosas 4T1 se tiñeron con calceína AM (Thermo Fisher Scientific Inc., 10 mM) de acuerdo con el método usado para la Figura 21(C). Después de lavar tres veces con 10 ml de RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, las células se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células por pocillo, y células T citotóxicas ($1 \times 10^5/100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) se añadieron a cada pocillo y se incubaron en una incubadora a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 4 horas. Las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} vivas que mostraron fluorescencia verde y las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} muertas que no mostraron fluorescencia verde o las células cancerosas 4T1 se analizaron mediante citometría de flujo, y el efecto citotóxico de las células T citotóxicas se expresó como porcentaje. Como resultado, se demostró que el efecto citotóxico de las células T citotóxicas que se mejoró mediante la administración de mono-mIL-12-Fc era específico de la célula diana.

La Figura 23(E) muestra los resultados de la medición del efecto citotóxico de las células asesinas naturales, aisladas del bazo de ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A), contra células cancerosas CT26^{HER2/Neu}.

Específicamente, 3 días después de la tercera administración de la citocina en la Figura 21(A), los ratones se sacrificaron, y el bazo se diseccionó a partir de él y se trituró en un plato de 70 mm que contenía una malla de 70 micras y PBS. A las células obtenidas mediante centrifugación, se añadió tampón de lisis de glóbulos rojos para lisar los glóbulos rojos. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo anti-CD3 conjugado con APC (Thermo Fisher Scientific) y anticuerpo anti-CD49b conjugado con PE a 4 °C durante 30 minutos. Después de que las células se lavaron con PBS, las células asesinas naturales ($CD3^+CD49b^+$) se aislaron mediante el uso de FACS Aria III (BD biosciences, Corea). Para medir el efecto citotóxico de las células asesinas naturales contra las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} dianas, las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} se tiñeron con calceína AM (Thermo Fisher Scientific Inc., 10 µM). Las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} (2×10^6) se suspendieron en 2 ml de DPBS y se mezclaron con 2 µl de calceína AM (10 mM), y después se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 45 minutos. Después de lavar con 10 ml de RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, las células se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células por pocillo, y células asesinas naturales ($1 \times 10^5/100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 4 horas. Las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} vivas que mostraron fluorescencia verde y las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} muertas que no mostraron fluorescencia verde se analizaron mediante citometría de flujo, y el efecto citotóxico de las células asesinas naturales se expresó como porcentaje. Se demostró que las células asesinas naturales aisladas de los ratones trasplantados con tumor administrados con mono-mIL-12-Fc mostraron un efecto citotóxico más alto contra las células cancerosas CT26^{HER2/Neu} dianas en comparación con las células asesinas naturales aisladas de los ratones trasplantados con tumor administrados con bi-mIL-12-Fc o las células T citotóxicas aisladas del grupo de control. Además, se demostró que el efecto inhibidor de la formación tumoral de mono-mIL-12-Fc se atribuyó al efecto citotóxico directo de algunas células asesinas naturales contra células cancerosas.

Ejemplo de referencia 18: Evaluación de la capacidad de mono-mIL-12-Fc para formar células T efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺ *in Vivo*

La producción de inmunidad adaptativa en ratones trasplantados con tumor se evalúa mediante la generación de células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺. Se midió si el efecto de eliminación tumoral de mono-mIL-12-Fc sería atribuible a la generación de células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺.

- 5 Las Figuras 24(A), 24(B) y 24(C) muestran los resultados de medir el número de células T efectoras CD8⁺, células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺ producidas cuando se administró mono-mIL-12-Fc a ratones portadores de tumores.
- 10 Específicamente, después del tratamiento como se muestra en la Figura 21(A), el bazo de ratón se diseccionó 34 días después del trasplante de tumor, se trituró mediante el uso de una malla amplia en una placa de Petri y después se lavó con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lisar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS para preparar una suspensión de células del bazo, y el número de células se contó con un hemocitómetro. Se añadieron anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD62L y anti-receptor de IL-7 (IL-7R) conjugados con APC, FITC, PE o PE-cy5 a las células del bazo que después se tiñeron a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS frío (pH 7,4) y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) y Flow jo (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos, y la población celular CD3⁺CD8⁺CD62L^{bajo}IL-7R^{bajo}, la población celular CD3⁺CD8⁺CD62L^{bajo}IL-7R^{alto} y la población celular CD3⁺CD8⁺CD62L^{alto}IL-7R^{alto} se definieron como células T efectoras CD8⁺, células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺, respectivamente, y las proporciones de estas con relación a las células del bazo totales se calcularon y se multiplicaron por el número de células contadas con un hemocitómetro, y se analizó el número de células T efectoras CD8⁺, células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺ que aumentó después de la administración de mono-mIL-12-Fc.
- 15 20 25 Como resultado, se pudo ver que, en comparación con el control, mono-mIL-12-Fc aumentó de forma dependiente de la concentración el número de células T de memoria efectoras CD8⁺ y de células T de memoria CD8⁺ en ratones trasplantados con tumor. Sin embargo, bi-mIL-12-Fc aumentó el número de células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺ solo en el grupo administrado a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 0,5 µg de IL-12, y no aumentó el número de células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺ en el grupo administrado con el mismo a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 1 µg de IL-12. Por lo tanto, se descubrió que el mayor efecto inhibitorio de la formación tumoral de mono-mIL-12-Fc se atribuyó al mayor número de células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺, en comparación con bi-mIL-12-Fc.
- 30 35 La Figura 24(D) muestra los resultados obtenidos mediante el retransplante de células cancerosas CT26^{HER2/Neu} en los ratones sobrevivientes a los 120 días después de la administración de 1 µg de mono-IL-12-Fc en la Figura 21(A) y medir los cambios en el volumen tumoral en los ratones.
- 40 45 50 Específicamente, 120 días después de la última administración de 1 µg mono-IL-12-Fc a los ratones Balb/c hembras (NARA Biotech, Corea) en la Figura 21(A), los ratones sobrevivientes se afeitaron y se trasplantaron células CT26^{HER2/Neu} (1 X 10⁶ células/ratón) diluidas en 150 µl de PBS por vía subcutánea a los ratones. A continuación, el tumor se midió dos veces a la semana sin administración adicional de 1 µg de mono-IL-12-Fc, y el volumen tumoral (V) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación: V=longitud X ancho²/2. Como resultado, se pudo ver que, en comparación con el grupo de control, el tumor en los ratones que sobrevivieron después de la administración de 1 µg de mono-mIL-12-Fc comenzó a disminuir a partir de los 11 días. Por lo tanto, se descubrió que cuando se administró mono-mIL-12-Fc a los ratones trasplantados con tumor, produjo células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺, y por lo tanto, incluso cuando un tumor se trasplantó nuevamente a los ratones, se eliminaría.
- Ejemplo de referencia 19: Evaluación de la capacidad de mono-mIL-12-Fc para formar células T efectoras precursoras de memoria CD8⁺ *in Vivo*
- 55 60 En los Ejemplos 16 y 18, se observó que el efecto de bi-mIL-12-Fc en el aumento del número de células T CD8⁺, células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria central CD8⁺ en ratones trasplantados con tumor fueron más bajas que las de mono-mIL-12-Fc. Se informó que después de la fase efectora en la que se activaron las células T CD8⁺ destruyen directamente las células tumorales, las células T efectoras CD8⁺ se diferencian parcialmente en células efectoras precursoras de memoria (MPEC) y después en células T de memoria CD8⁺, y se diferencian principalmente en células efectoras de vida corta (SLEC). Por tanto, se realizó un análisis para determinar si las células T CD8⁺ activadas por la administración de bi-mIL-12-Fc se diferenciarían en células efectoras de vida corta y, por tanto, el número de células T de memoria CD8⁺ producidas fue pequeño, de manera que no pudieron eliminar los tumores.
- 65 La Figura 24(E) muestra los resultados del análisis de las proporciones de células efectoras precursoras de memoria (KLRG1⁻IL-7R⁺) y células efectoras de vida corta (KLRG1⁺IL-7R⁻) en las células T CD8⁺ presentes en el bazo de ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A).

Específicamente, después del tratamiento como se muestra en la Figura 21(A), el bazo de ratón se diseccionó 24 días después del trasplante de tumor, se trituró mediante el uso de una malla amplia en una placa de Petri y después se lavó con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lizar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS para preparar una suspensión celular.

5 Se añadieron anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-KLRG1 y anti-IL-7 receptor (IL-7R) conjugados con APC, FITC, PE o PE-cy5 a las células del bazo que después se tiñeron a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS frío (pH 7,4) y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) y Flow jo (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos, y la población celular CD3⁺CD8⁺KLRG1⁺IL-7R⁺ y la población celular CD3⁺CD8⁺KLRG1⁺IL-7R⁻ se definieron como células efectoras precursoras de memoria y células efectoras de vida corta, respectivamente, y se analizaron las proporciones de estas con relación a las células del bazo totales.

10 Como resultado, se pudo ver que, en comparación con el control, mono-mIL-12-Fc aumentó de forma dependiente de la concentración la proporción de células efectoras precursoras de memoria en los ratones trasplantados con tumor. Sin embargo, la administración de bi-mIL-12-Fc no aumentó la proporción de células efectoras precursoras de memoria en comparación con el control, sino que aumentó el número de células efectoras de vida corta. Por lo tanto, se descubrió que el mono-mIL-12-Fc aumentó significativamente el número de células T de memoria efectoras CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺, en comparación con bi-mIL-12-Fc, al promover la producción de células efectoras precursoras de memoria, lo que indica que tiene un mayor efecto sobre la eliminación del tumor.

15 Ejemplo de referencia 20: Evaluación del efecto de mono-mIL-12-Fc sobre la expresión de factores de transcripción involucrados en la inducción de la diferenciación de células de memoria

20 Se informó que cuando las células T CD8⁺ se administraron con altas concentraciones de IL-12 o se activaron mediante la administración de IL-12 con frecuencia durante 2 días o más, aumenta la expresión del factor de transcripción T-bet que permite la diferenciación de células T CD8⁺ en células efectoras de vida corta y disminuye la expresión del factor de transcripción eomesodermina (Eomes) que permite la diferenciación de células T CD8⁺ en células efectoras precursoras de memoria. Por tanto, se realizó un análisis para determinar si mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc regularían diferencialmente la expresión de T-bet y Eomes en células T CD8⁺ para cambiar la proporción de células T CD8⁺ que se diferencian en células efectoras de vida corta.

25 Las Figuras 25(A) y 25(B) muestran los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir las proporciones de células T CD8⁺ (que muestran una alta expresión de T-bet que inhibe la diferenciación de células de memoria) y células T CD8⁺ (que muestran una baja expresión de Eomes que promueve la diferenciación de células de memoria) en el bazo de ratones sacrificados 3 días después de la tercera administración en la Figura 21(A).

30 Específicamente, después del tratamiento como se muestra en la Figura 21(A), el bazo de ratón se diseccionó 24 días después del trasplante de tumor, se trituró mediante el uso de una malla de alambre en una placa de Petri y después se lavó con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lizar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS para preparar una suspensión celular. Las células del bazo se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 conjugados con PE-cy5 o FITC a 4 °C durante 30 minutos y se lavaron con PBS frío (pH 7,4). Despues, las células se fijaron con el conjunto de tampones de tinción de factor de transcripción/Foxp3 (Thermo Fisher Scientific) (que es un reactivo de tinción de factores de transcripción intranucleares) y se permeabilizaron. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpo anti-T-bet o anti-Eomes conjugado con PE o efluor 660 a 4 °C durante 30 minutos, y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) en tampón de permeabilización y Flow jo (Thermo Fisher Scientific) para el análisis de datos de citometría de flujo. Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos y se analizaron las proporciones de la población celular CD3⁺CD8⁺T-bet^{alto} y la población celular CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{bajo}. Como resultado, se pudo ver que, en comparación con el control, mono-mIL-12-Fc redujo de forma dependiente de la concentración la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺T-bet^{alto} y aumentó la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{bajo}. Sin embargo, bi-mIL-12-Fc redujo la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺T-bet^{alto} solo en el grupo administrado con la misma concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 0,5 µg de IL-12 y aumentó la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{bajo} en el grupo. Además, en el grupo administrado con bi-mIL-12-Fc a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 1µg de IL-12, bi-mIL-12-Fc no mostró el efecto de reducir la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺T-bet^{alto} o aumentar la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{bajo}. Por lo tanto, se descubrió que, en comparación con bi-mIL-12-Fc, mono-mIL-12-Fc tenía un efecto mayor de eliminación de tumores mediante la reducción de la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺T-bet^{alto} y aumentar la proporción de la población celular CD3⁺CD8⁺Eomes⁺T-bet^{bajo} para aumentar significativamente el número de células T CD8⁺ y células T de memoria CD8⁺.

35 Se conoce que cuando las células T CD8⁺ se estimulan con citocinas inflamatorias tales como IL-12 en presencia de una señal del receptor de células T y una señal coestimuladora, la fosforilación de STAT4 aumenta y el STAT4 fosforilado (pSTAT4) migra al núcleo y se une al potenciador de T-bet, lo que aumenta de esta manera la expresión de T-bet. Por lo tanto, se realizó un análisis para determinar si la diferenciación de las células T CD8⁺ en células efectoras de vida corta, lo que ocurrió cuando se administró bi-mIL-12-Fc a una concentración correspondiente a una

cantidad molar equivalente de 1 µg de IL-12, sería porque la administración de bi-mIL-12-Fc a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente de 1 µg de IL-12 aumentó la expresión de pSTAT4 y T-bet cuando las células T se activaron en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor de los ratones trasplantados con tumor, en comparación con mono-mIL-12-Fc.

5 La Figura 25(C) muestra los resultados del análisis de citometría de flujo realizado para medir el nivel de expresión de STAT4 fosforilado en las células T CD8⁺ aisladas del ganglio linfático de drenaje del tumor 24 horas después de administrar intraperitonealmente bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc una vez a una concentración correspondiente a la cantidad molar equivalente de 1 µg de rmIL-12 cuando el volumen tumoral en los ratones Balb/c trasplantados con CT26^{HER2/Neu} alcanzó 300 mm³.

10 Específicamente, como se describe con respecto a la Figura 23(B), cuando el volumen tumoral en los ratones Balb/c trasplantados con células de cáncer colorrectal CT26^{HER2/Neu} alcanzaron 300 mm³, se administraron bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc por vía intraperitoneal a los ratones a una concentración equimolar a 1 µg de rmIL-12. Después de 15 24 horas, se diseccionó el ganglio linfático de drenaje del tumor de los ratones, se trituró mediante el uso de una malla de alambre en una placa de Petri y después se lavó con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lisar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS, lo que preparó así una suspensión celular. Las células de los ganglios linfáticos de drenaje se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 conjugados con PE-cy5 o FITC a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS 20 (pH 7,4) y después se fijaron en metanol frío. A continuación, las células de los ganglios linfáticos de drenaje se lavaron con PBS frío (pH 7,4), se tiñeron con anticuerpo anti-pSTAT4 conjugado con APC a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS frío (pH 7,4) y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) y Flow jo (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos y se compararon los niveles 25 de expresión de pSTAT4 en células T CD3⁺CD8⁺. Como resultado, en comparación con mono-mIL-12-Fc, bi-mIL-12-Fc mostró el efecto de aumentar la expresión de pSTAT4 cuando las células T CD8⁺ se activaron en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor de los ratones trasplantados con tumor.

30 La Figura 25(D) muestra los resultados de la citometría de flujo realizada para medir la proporción de células T CD8⁺ (que expresan T-bet que inhibe la diferenciación de células de memoria) en el ganglio linfático de drenaje del tumor a las 72 horas después de una única administración intraperitoneal en la Figura 25(C).

35 Específicamente, como se describe con respecto a la Figura 23(B), cuando el volumen tumoral en los ratones Balb/c trasplantados con células de cáncer colorrectal CT26^{HER2/Neu} alcanzaron 300 mm³, se administraron bi-mIL-12-Fc y mono-mIL-12-Fc por vía intraperitoneal a los ratones a una concentración correspondiente a la cantidad molar equivalente de 1 µg de rmIL-12. Después de 72 horas, se diseccionó el ganglio linfático de drenaje del tumor de los ratones, se trituró mediante el uso de una malla de alambre en una placa de Petri y después se lavó con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lisar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS, lo que preparó así una suspensión celular. Las células de los ganglios linfáticos de drenaje se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 conjugados con PE-cy5- o FITC 40 a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS (pH 7,4), se fijaron mediante el uso del conjunto de tampones de tinción de factor de transcripción/Foxp3 (Thermo Fisher Scientific) (que es un reactivo de tinción de factores de transcripción intranucleares) y después se permeabilizaron. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpo anti-T-bet conjugado con PE o APC a 4 °C durante 30 minutos y después se analizaron mediante citometría de flujo (FACS 45 Calibur (BD Bioscience) en tampón de permeabilización y análisis Flow jo (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos y se comparó la proporción de células T CD3⁺CD8⁺ que expresan T-bet. Como resultado, en comparación con mono-mIL-12-Fc, bi-mIL-12-Fc mostró el efecto de aumentar la expresión de T-bet cuando las células T CD8⁺ se activaron en los ganglios linfáticos de drenaje de los ratones trasplantados con tumor. Por tanto, se descubrió que la diferenciación de las células T CD8⁺ en células efectoras de vida corta, lo que ocurrió 50 cuando se administró bi-mIL-12-Fc a una concentración correspondiente a una cantidad molar equivalente 1 µg de IL-12, fue porque la administración de bi-mIL-12-Fc aumentó la expresión de pSTAT4 y T-bet, en comparación con mono-mIL-12-Fc, cuando se activaron las células T en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor de los ratones trasplantados con tumor.

55 Las Figuras 25(E) y 25(F) muestran el resultado de medir si cuando mono-mIL-12-Fc reaccionó de forma cruzada con anticuerpo anti-Fc, como bi-mIL-12-Fc que expresa dos moléculas de L-12, de manera que las células T CD8⁺ podrían estimularse mediante dos moléculas L-12, la expresión de pSTAT4 y T-bet en las células aumentaría a un nivel similar al nivel mostrado cuando las células se trataron con bi-mIL-12-Fc.

60 Específicamente, se diseccionaron los bazos y los ganglios linfáticos de drenaje del tumor de ratones Balb/c normales, se trituraron mediante el uso de una malla de alambre en una placa de Petri y después se lavaron con 10 ml de medio que contenía FBS al 2 %. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a estos para lisar los glóbulos rojos, y las células resultantes se lavaron con PBS, lo que preparó así una suspensión celular. Las células de los ganglios linfáticos se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 conjugado con PE a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron

con PBS frío (pH 7,4), y se incubó con microesferas anti-PE (Miltenyi Biotec) durante 15 minutos, y las células T CD8⁺ se separaron de las mismas mediante el uso de un separador MACS y una columna LS (Miltenyi Biotec). 100 µl de 0,5 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 se añadió a cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos que después se incubó a 4 °C durante 12 horas y se lavó con PBS para eliminar el anticuerpo anti-CD3 no unido a la placa, y 50 µl de 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD28 se añadió a cada pocillo. A continuación, mono-mIL-12-Fc y bi-mIL-12-Fc se hicieron reaccionar con varias concentraciones de anticuerpo anti-Fc a 4 °C durante 30 minutos, y después se añadieron a cada pocillo a una concentración equimolar a 20 pM de IL-12. A continuación, se añadieron células CD8⁺ (4 X 10⁴/pocillo) a cada pocillo y se incubaron en una incubadora a 37 °C durante 3 horas para medir la expresión de pSTAT4 y durante 3 días para medir la expresión de T-bet. Para medir la expresión de pSTAT4 y T-bet, las células se tiñeron de acuerdo con el método descrito con respecto a las Figuras 25(C) y 25(D), y después se analizaron mediante citometría de flujo. Cada muestra se analizó mediante gráficos de puntos, y se compararon los niveles de expresión de pSTAT4 o T-bet en las células T CD8⁺. Como resultado, se demostró que cuando mono-mIL-12-Fc reaccionó de forma cruzada con anticuerpo anti-Fc de manera que las células T CD8⁺ podrían estimularse mediante dos moléculas de IL-12, los niveles de expresión de pSTAT4 y T-bet en las células aumentaron a los niveles mostrados cuando las células se trataron con bi-mIL-12-Fc.

En conclusión, como se muestra en la Figura 26, en comparación con bi-mIL-12-Fc, mono-mIL-12-Fc induce una baja expresión de pSTAT4 y T-bet en las células T CD8⁺ de manera que las células T CD8⁺ pueden diferenciarse en células efectoras precursoras de memoria y después en células efectoras de memoria y células de memoria central. Por lo tanto, el mono-mIL-12-Fc puede eliminar tumores de ratones trasplantados con tumor incluso a baja concentración (correspondiente a una cantidad molar equivalente de 0,5 µg de IL-12), lo que prolonga la expectativa de vida de los ratones. Sin embargo, bi-mIL-12-Fc induce una alta expresión de pSTAT4 y T-bet en células T CD8⁺ para que las células puedan diferenciarse en células efectoras de vida corta, lo que impide el desarrollo de células de memoria. Por lo tanto, cuando se administra bi-mIL-12-Fc a la misma concentración molar que la de mono-mIL-12-Fc, no puede eliminar completamente los tumores de los ratones trasplantados con tumor. Por lo tanto, solo cuando se administra bi-mIL-12-Fc a una concentración más alta (correspondiente a una cantidad molar equivalente de 2 µg de IL-12) y las células T citotóxicas CD8⁺ se expanden en la fase efectora que destruye directamente las células tumorales, bi-mIL-12-Fc puede eliminar los tumores.

30 Aplicabilidad industrial

La proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que puede retener la actividad de una proteína fisiológicamente activa de origen natural, que está compuesta de dos o más proteínas subunitarias diferentes y de esta manera exhibe la actividad fisiológica al formar una proteína ensamblada, porque cada subunidad de la proteína puede fusionarse por separado a cada cadena de Fc heterodimérico de inmunoglobulina de manera que la proteína fusionada puede mantener la forma y estructura de origen natural en el grado más alto posible. Además, la semivida *in vivo* de la proteína fisiológicamente activa contenida en la proteína fusionada a Fc heterodimérico puede aumentarse significativamente debido a la semivida larga mediada por Fc heterodimérico de manera que las actividades fisiológicas de estas *in vivo* puede durar mucho tiempo.

Además, la proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que es posible producir fácilmente una proteína fusionada a Fc heterodimérico en la configuración nativa sin necesidad de optimizar un proceso de purificación adicional.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es solo para una modalidad preferida y no limita el alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá mediante las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de estas.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una proteína fusionada a Fc heterodimérico monovalente que comprende una primera región Fc y una segunda
 5 región Fc de un par de Fc (fragmento cristalizable) de inmunoglobulina y subunidades p35 (IL-12A) y p40 (IL-
 12B) de interleucina-12 (IL-12) humana,
 en donde la subunidad p40 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la primera región Fc;
 en donde la subunidad p35 de IL-12 se une al extremo N-terminal de la segunda región Fc mediante el
 10 enlazador peptídico (G₄S)₃; en donde cada una de la primera región Fc y la segunda región Fc se deriva
 de una región Fc seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas;
 en donde los dominios CH3 de la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden cada uno, uno o
 15 más aminoácidos que promueven la heterodimerización, y
 en donde el uno o más aminoácidos que promueven la heterodimerización son triptófano en la posición
 409 en el dominio CH3 de la primera región Fc, valina en la posición 399 en el dominio CH3 de la segunda
 20 región Fc, y treonina en la posición 405 en el dominio CH3 de la segunda región Fc (en donde las
 posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU).
2. La proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera región Fc y
 25 la segunda región Fc se incluyen en una forma de anticuerpo completo seleccionada del grupo que consiste
 en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.
3. La proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio CH3 de
 30 la primera región Fc o la segunda región Fc comprende uno o más aminoácidos seleccionados del siguiente
 grupo (en donde las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU):
 (1) ácido glutámico (E), arginina (R), metionina (M), ácido aspártico (D), o histidina (H) en la posición 370 en
 el dominio CH3 de la primera región Fc; y
 (2) asparagina (N), ácido aspártico (D), alanina (A), isoleucina (I), glicina (G) o metionina (M) en la posición
 35 357 en el dominio CH3 de la segunda región Fc, y treonina (T) o triptófano (W) en la posición 364 en el
 dominio CH3 de la segunda región Fc.
4. La proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio CH3 de
 40 la primera región Fc o la segunda región Fc comprende uno o más aminoácidos seleccionados del siguiente
 grupo (en donde las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU):
 (1) ácido glutámico (E) en la posición 360 en el dominio CH3 de la primera región Fc, y;
 (2) arginina (R) en la posición 347 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
5. La proteína fusionada a Fc heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el dominio CH3 en
 45 la primera región Fc y el dominio CH3 en la segunda región Fc comprenden además los siguientes residuos
 (en donde las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice EU):
 (i) cisteína (C) en la posición 349 en el dominio CH3 de la primera región Fc; y
 (ii) cisteína (C) en la posición 354 en el dominio CH3 de la segunda región Fc.
6. Una composición farmacéutica que comprende la proteína fusionada a Fc heterodimérico de una cualquiera de
 50 las reivindicaciones 1 a 5.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en terapia.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en un método de tratamiento del
 55 cáncer.
9. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer se selecciona
 del grupo que consiste en cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de riñón,
 cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino,
 cáncer de pulmón, linfoma y cáncer de sangre.
10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde el método comprende
 60 la terapia combinada con otros fármacos contra el cáncer.

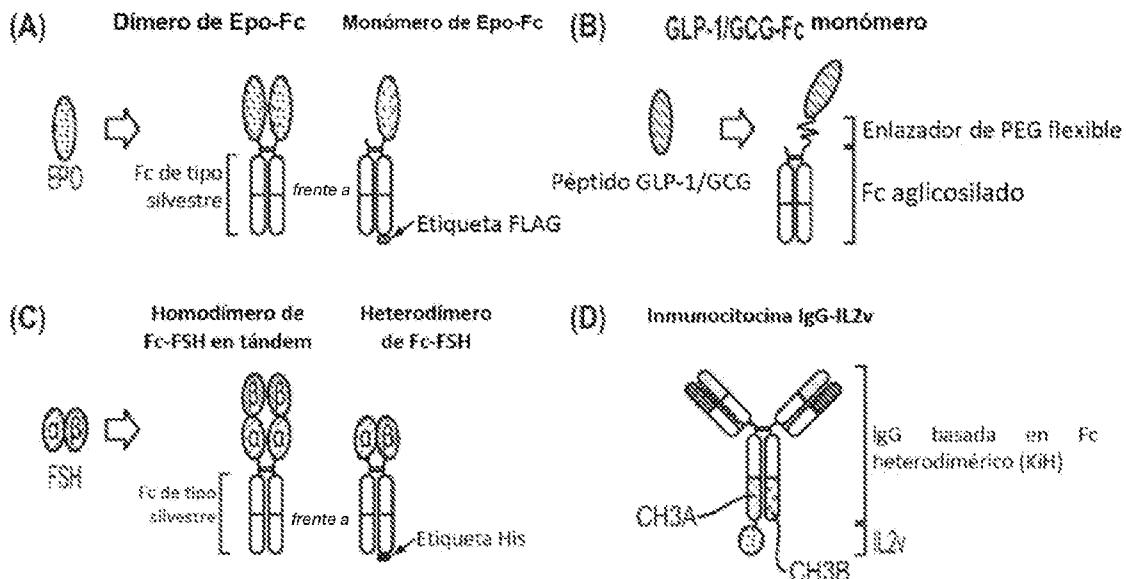


FIGURA 1

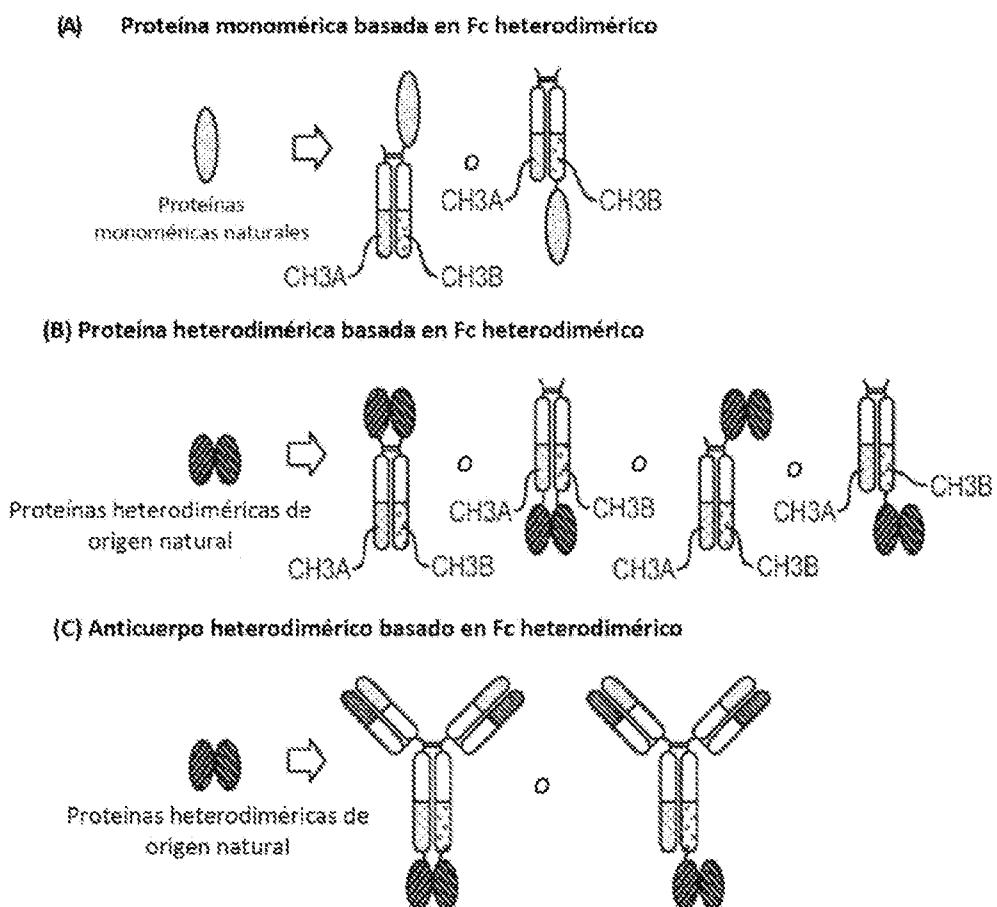


FIGURA 2

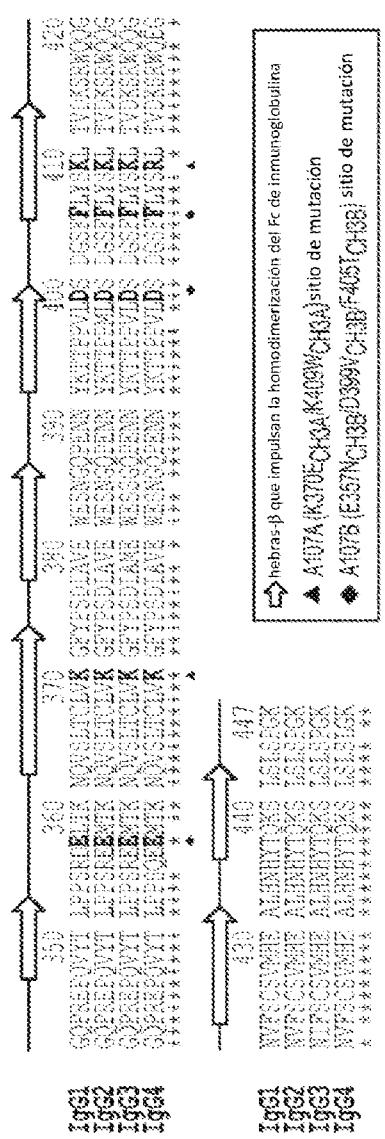


FIGURA 3

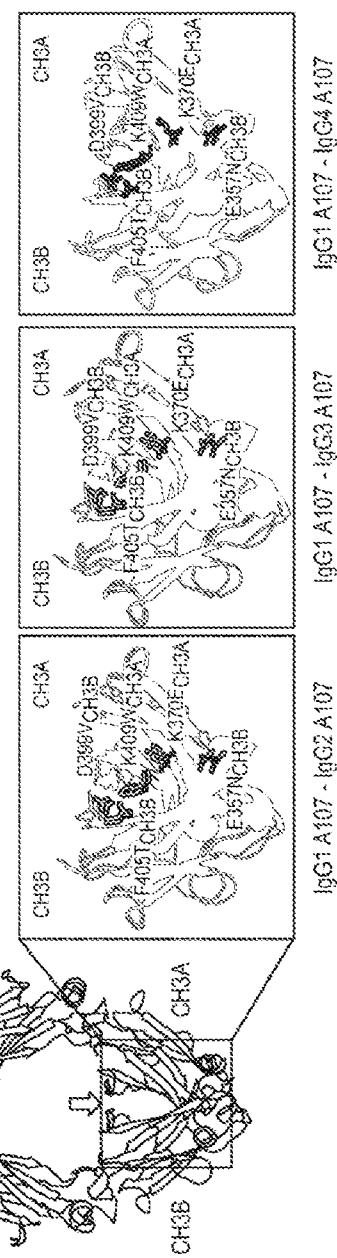


FIGURA 4

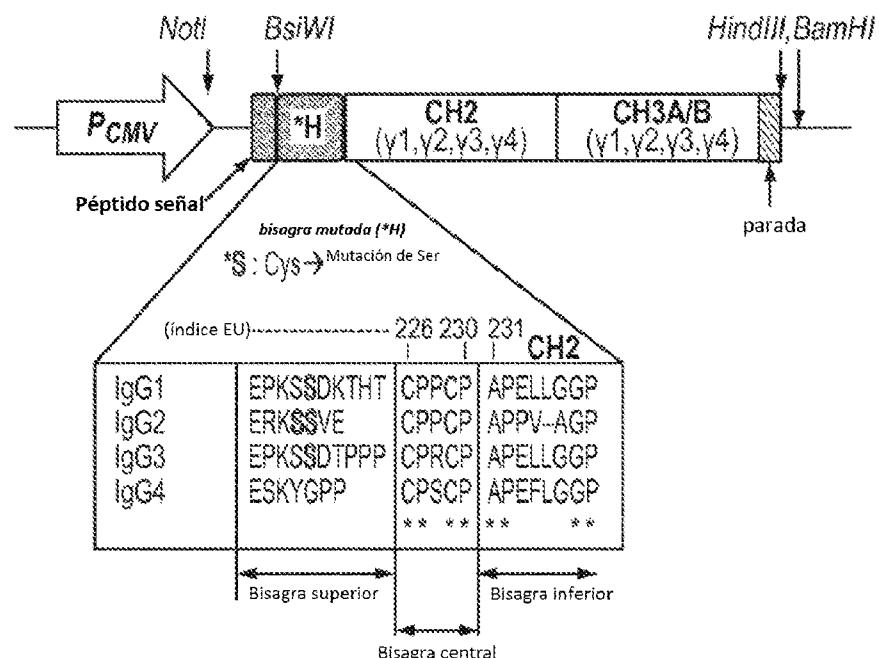


FIGURA 5

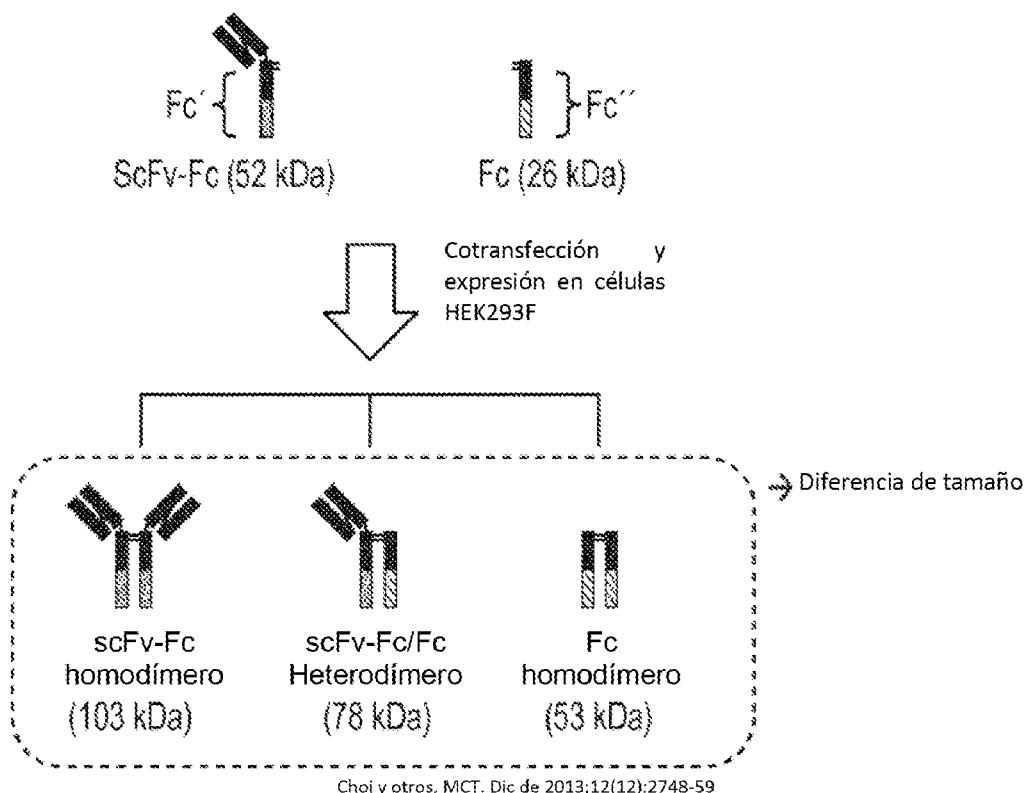
scFv-FcCH3A/FcCH3B Sistema de expresión

FIGURA 6

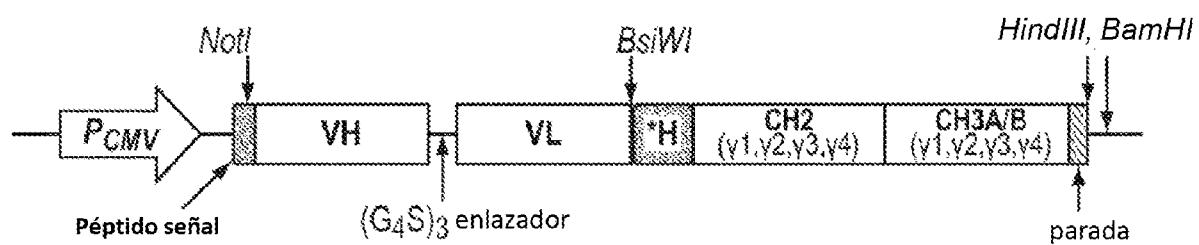


FIGURA 7

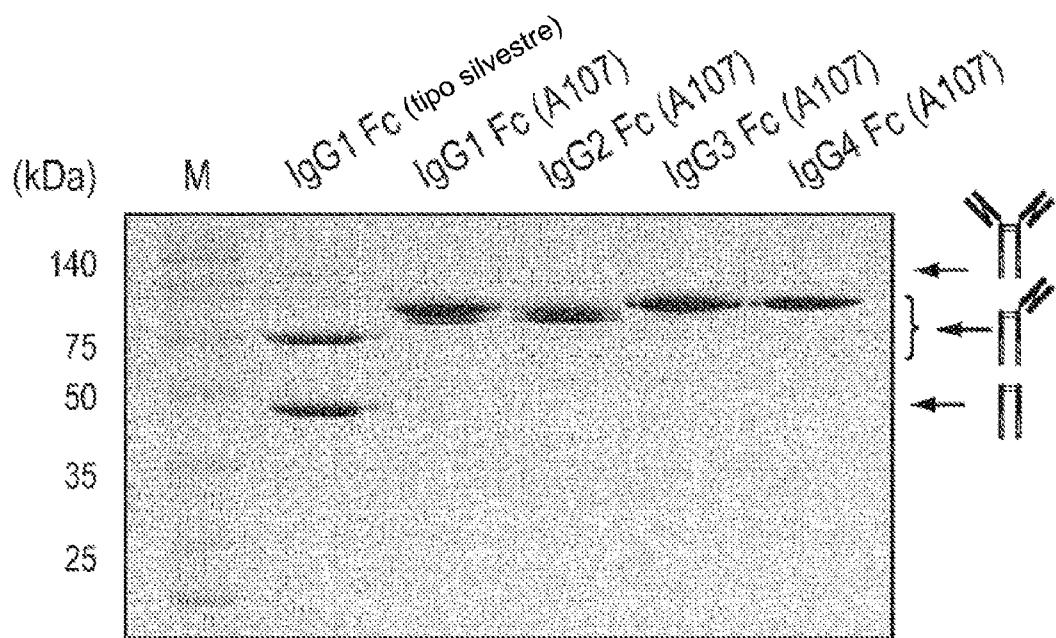


FIGURA 8

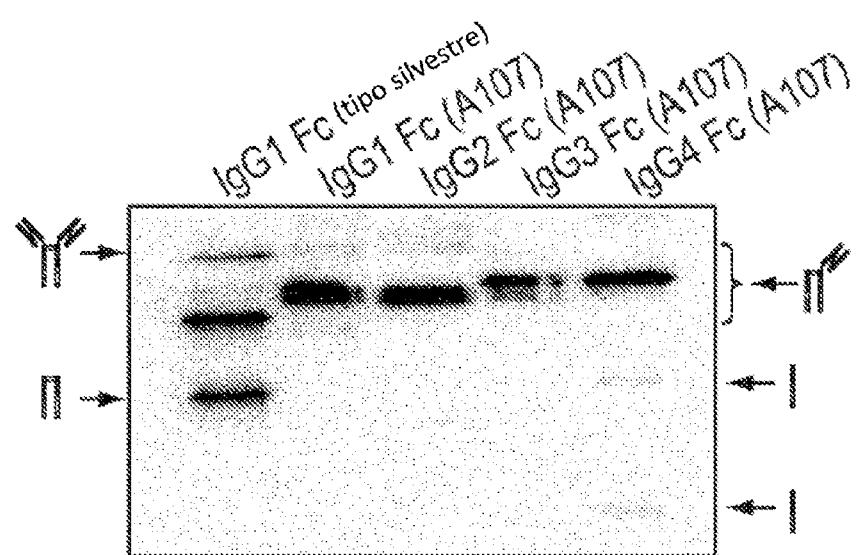


FIGURA 9

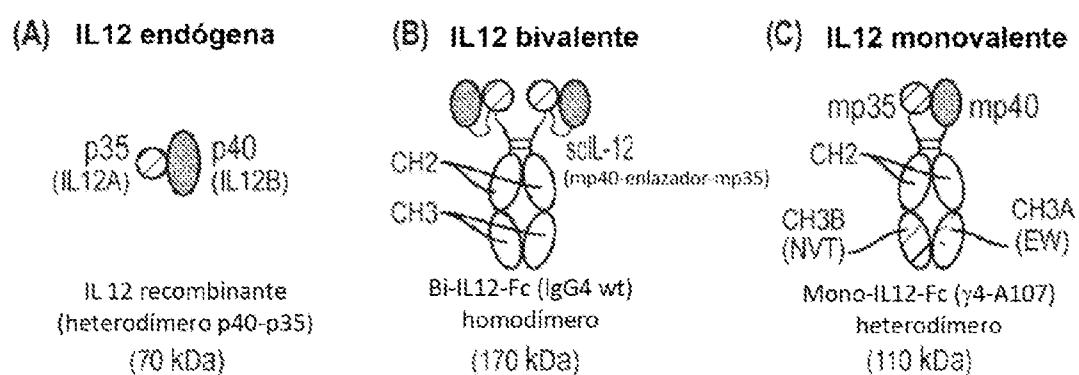


FIGURA 10

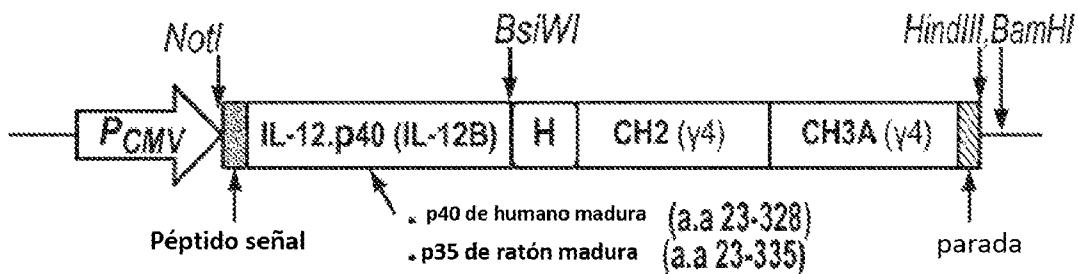


FIGURA 11A

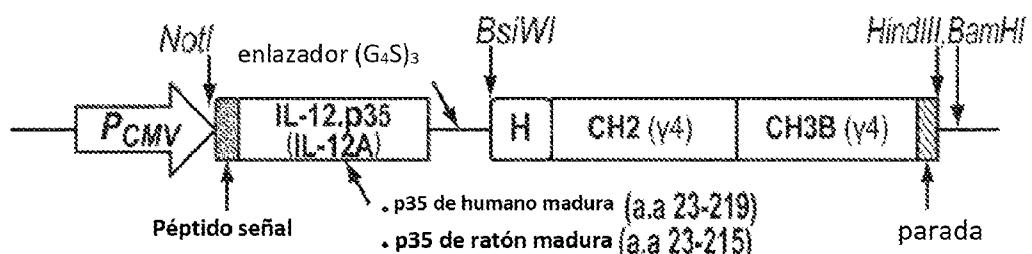


FIGURA 11B

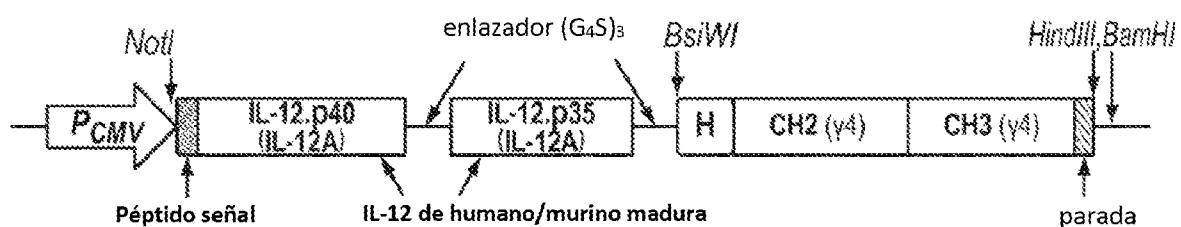


FIGURA 12

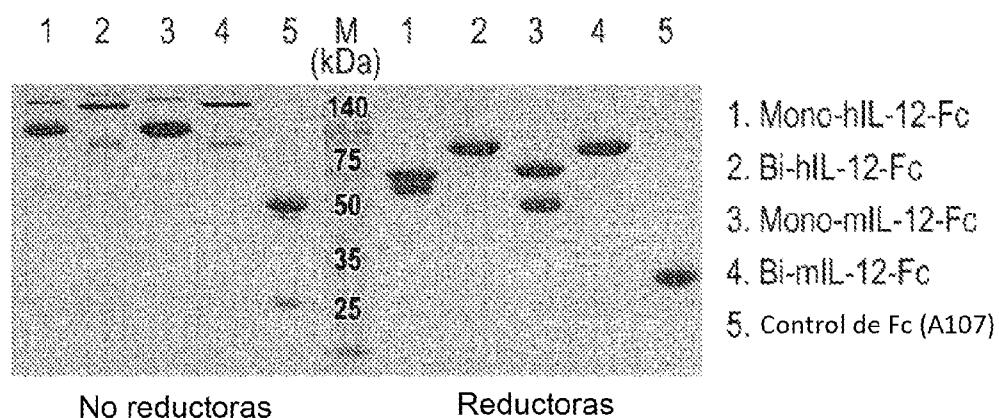


FIGURA 13

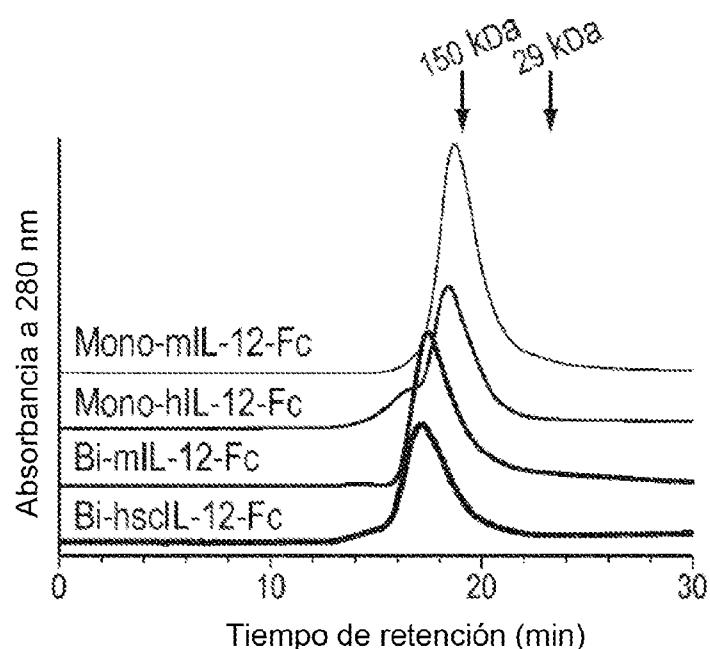


FIGURA 14

ES 3 000 558 T3

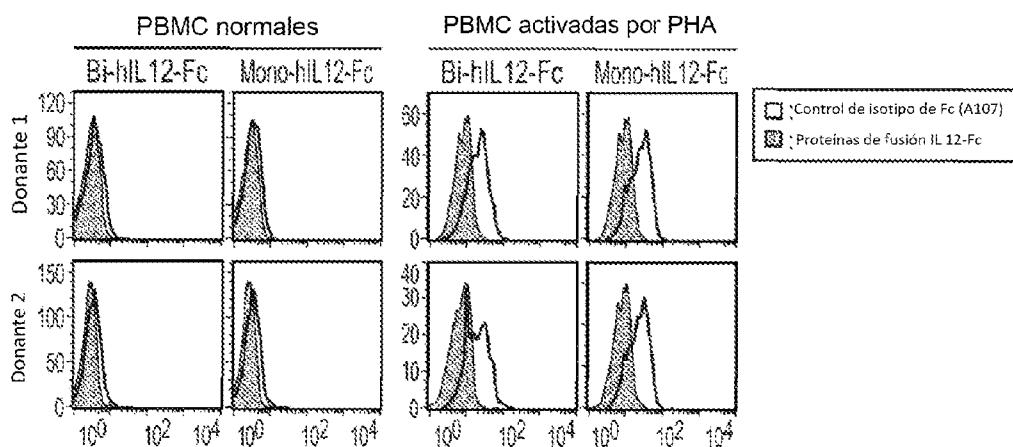


FIGURA 15

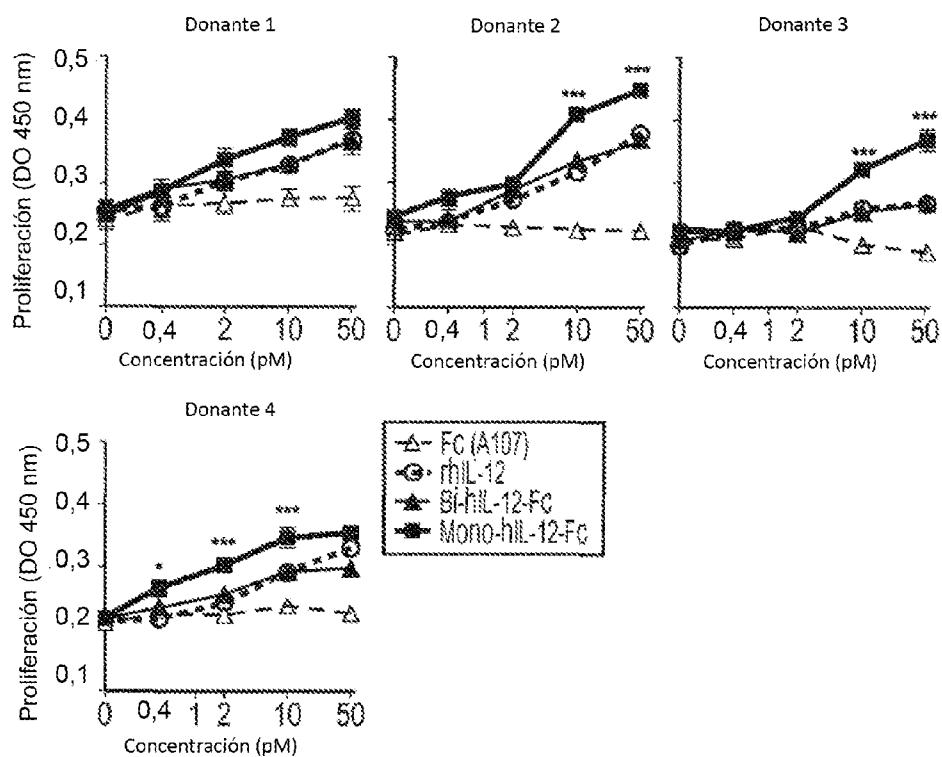


FIGURA 16

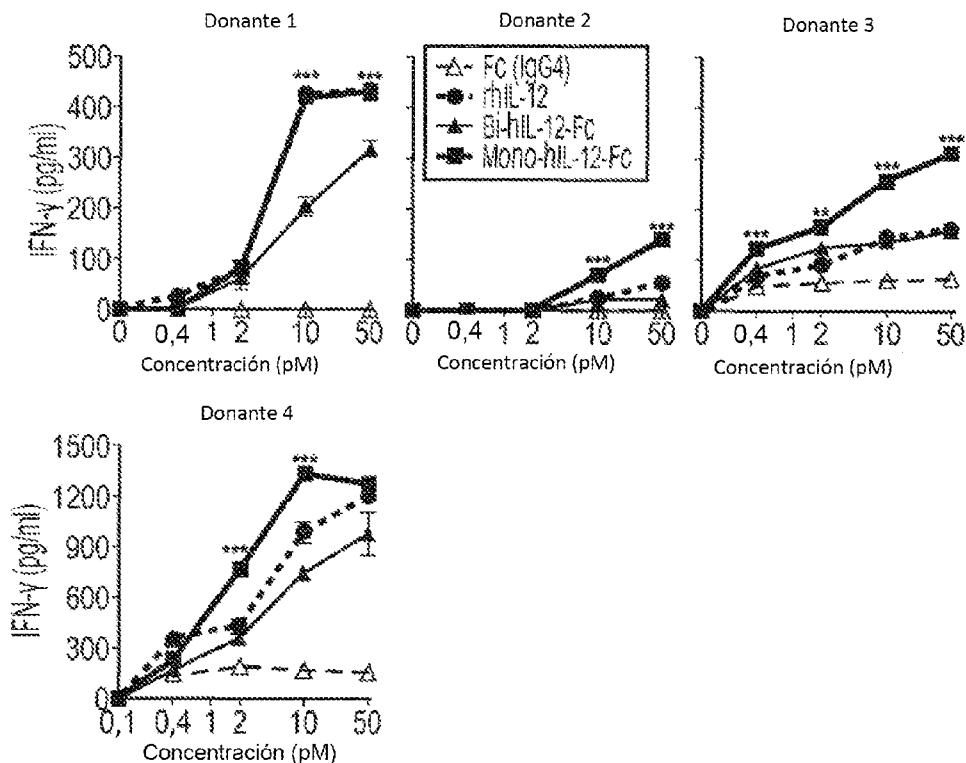


FIGURA 17

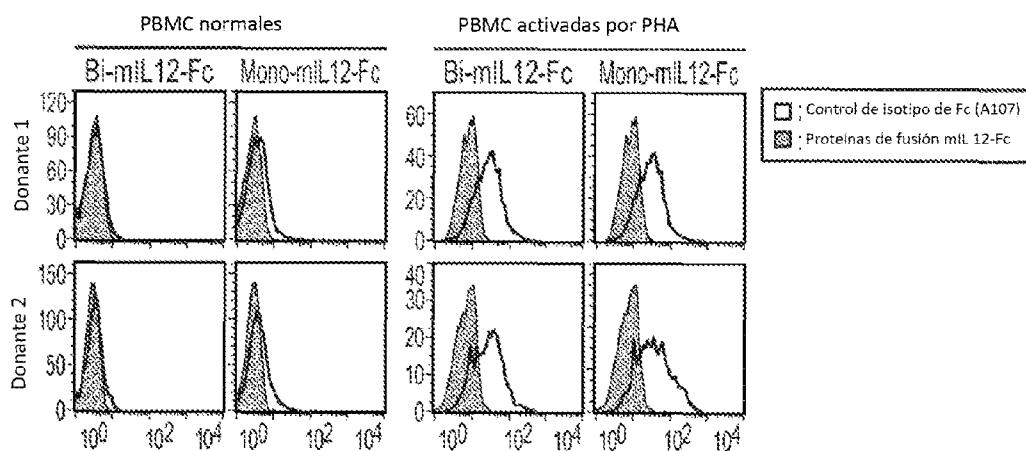


FIGURA 18

ES 3 000 558 T3

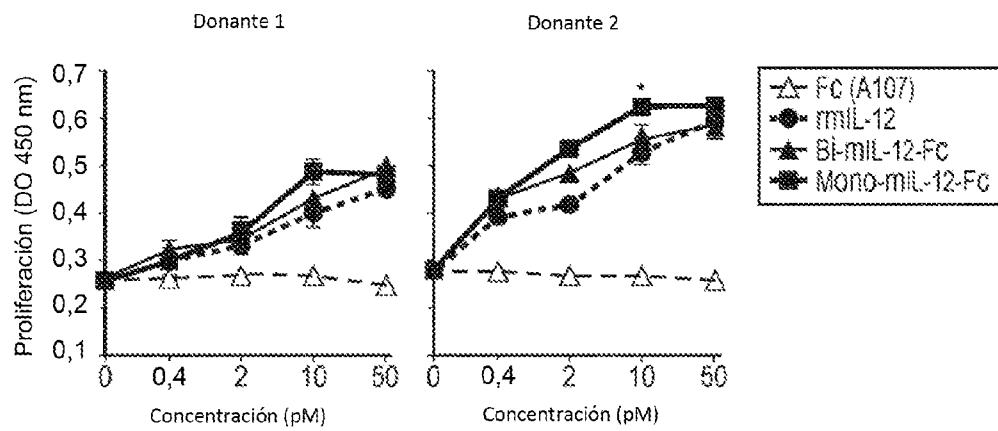


FIGURA 19

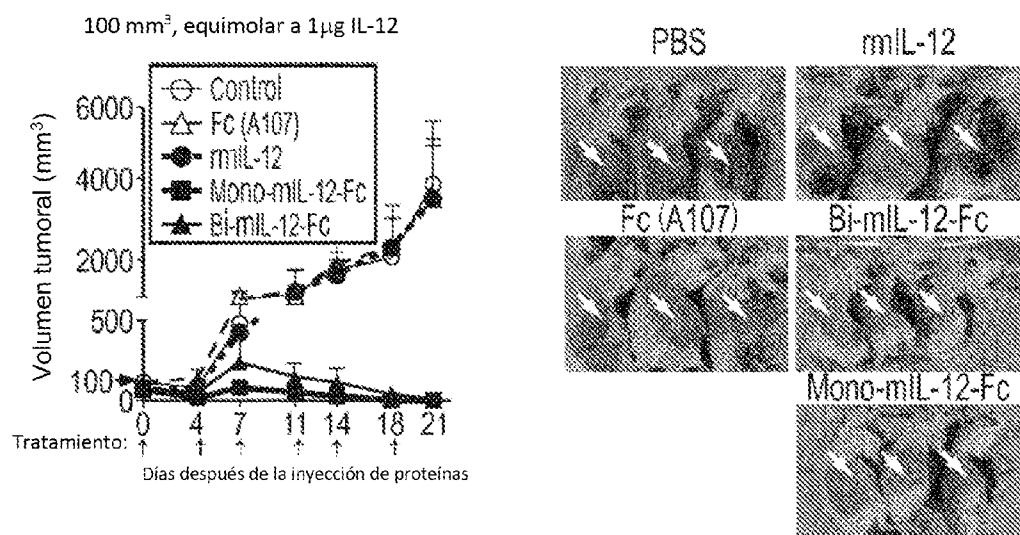


FIGURA 20A



FIGURA 20B

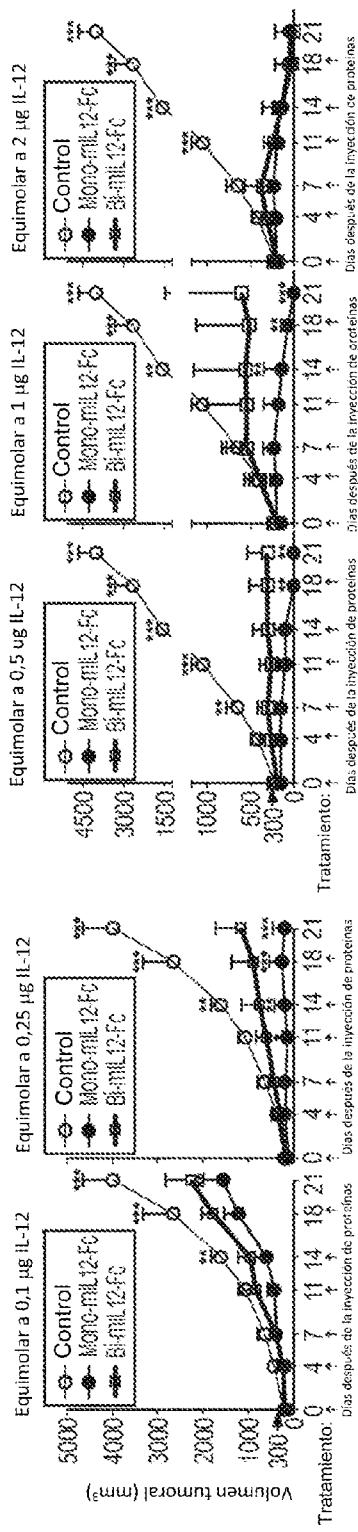


FIGURA 21A

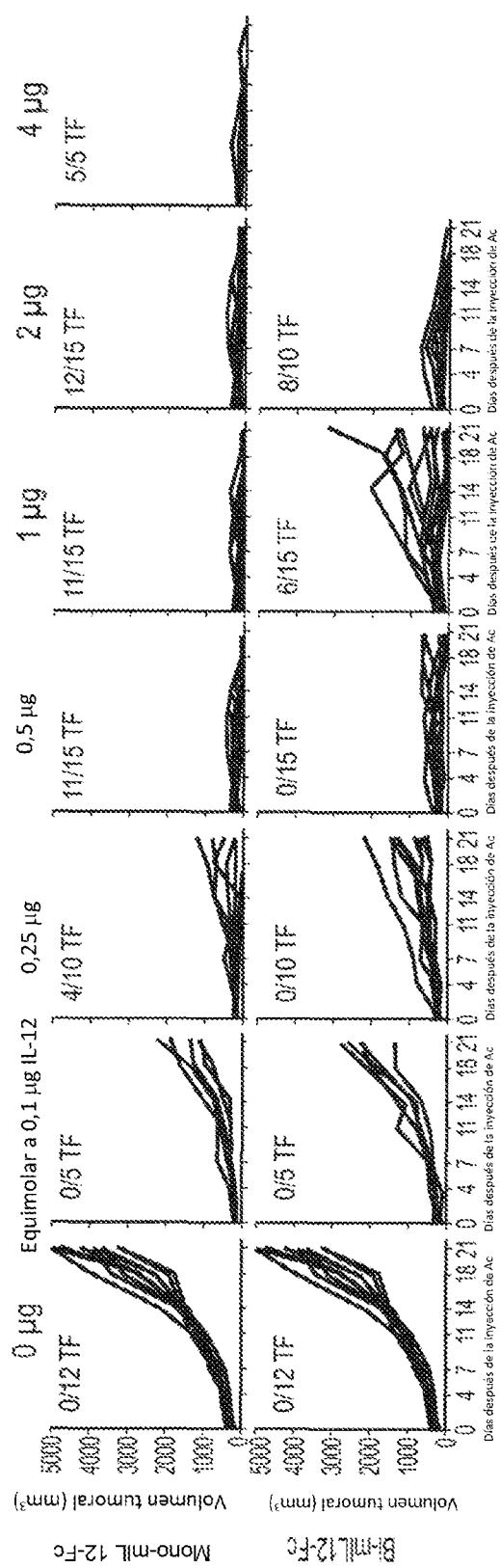


FIGURA 21B

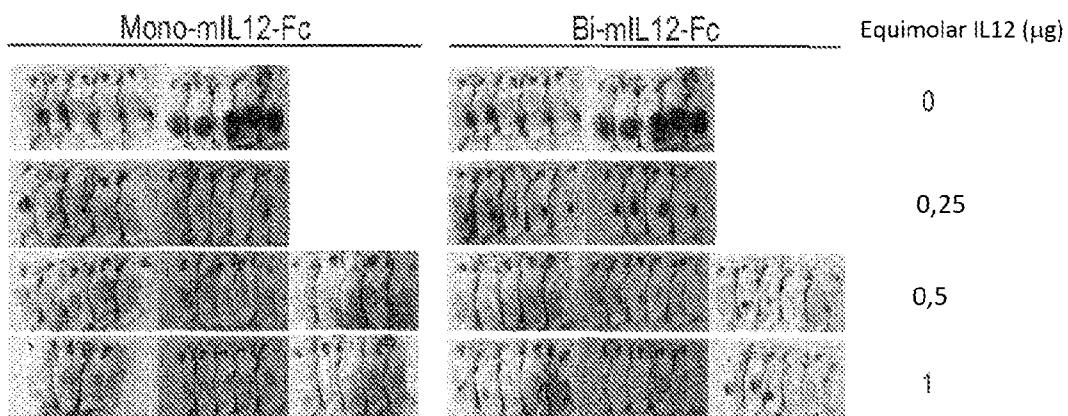


FIGURA 21C

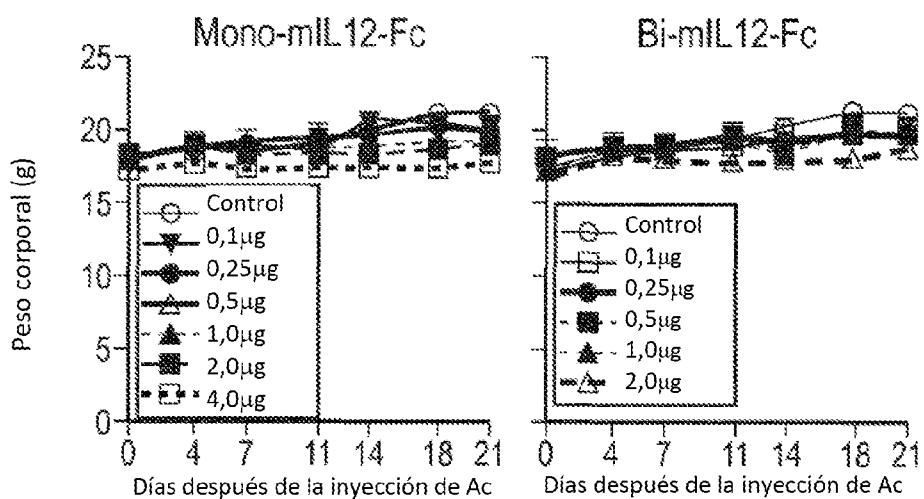


FIGURA 21D

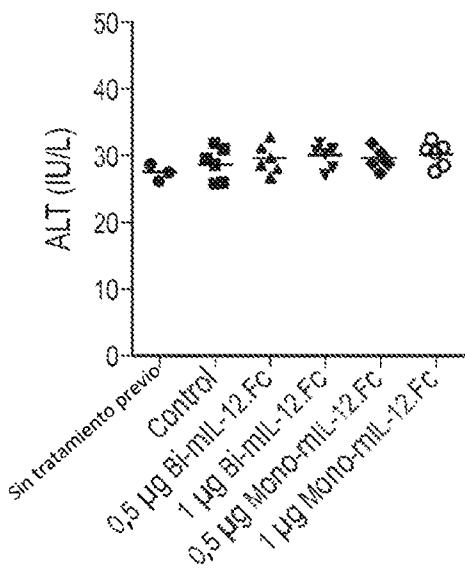


FIGURA 21E

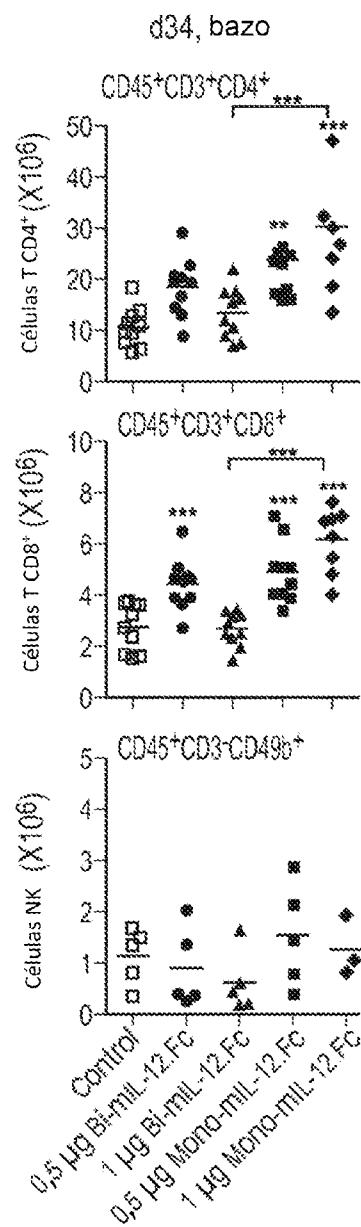


FIGURA 22A

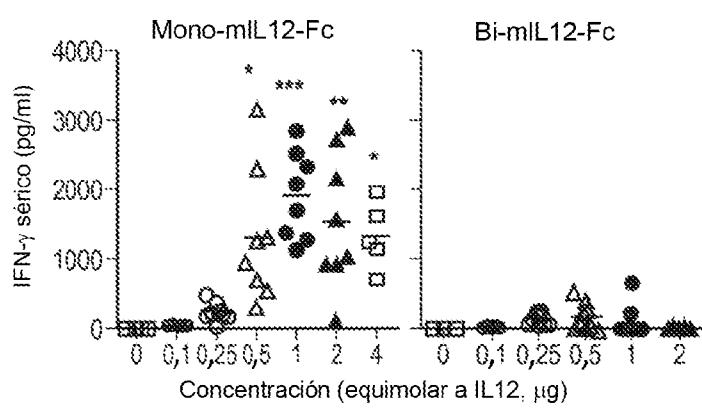
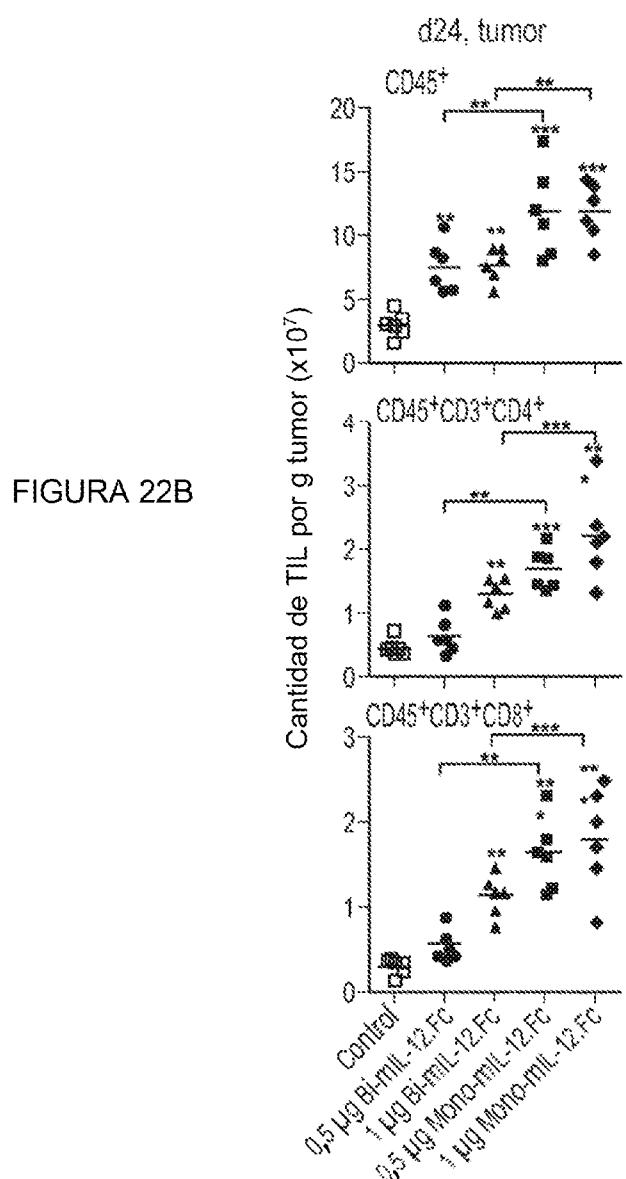


FIGURA 23A

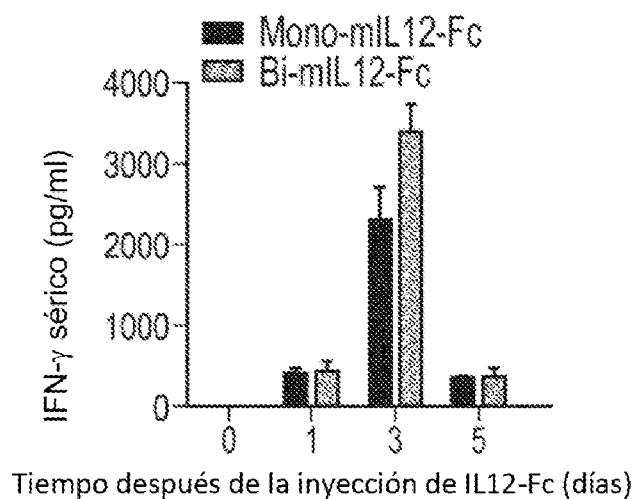


FIGURA 23B

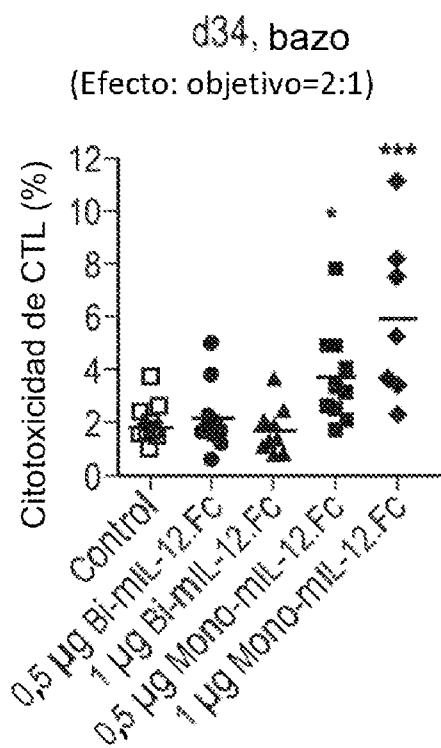


FIGURA 23C

ES 3 000 558 T3

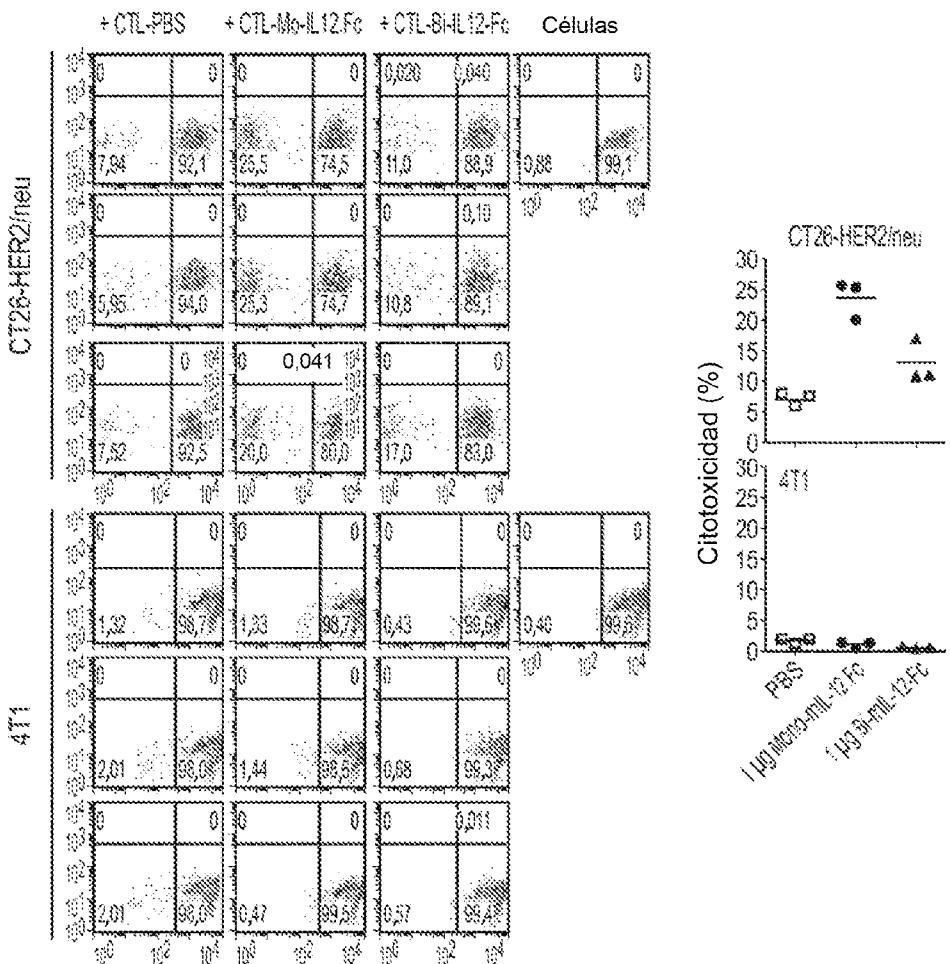


FIGURA 23D

d24, bazo
Efector: Objetivo=2:1

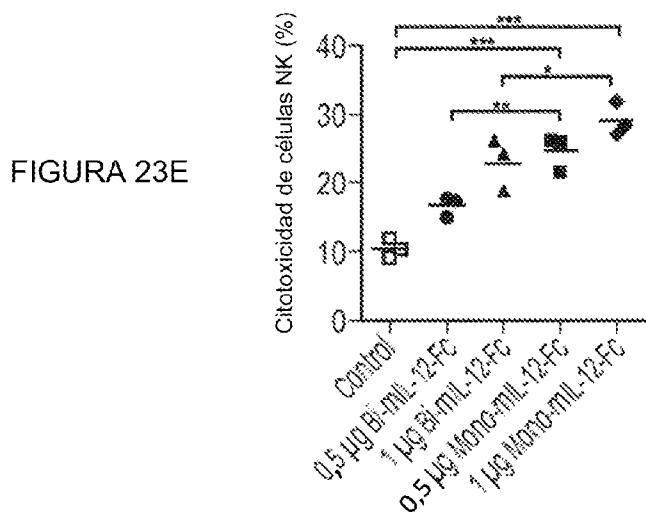


FIGURA 23E

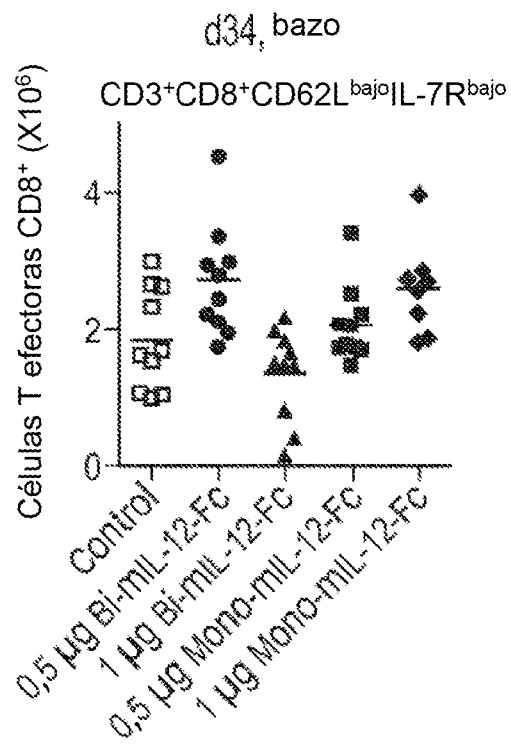


FIGURA 24A

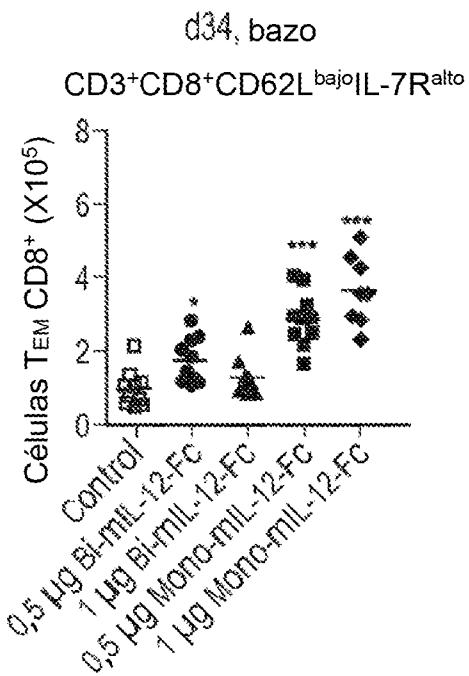


FIGURA 24B

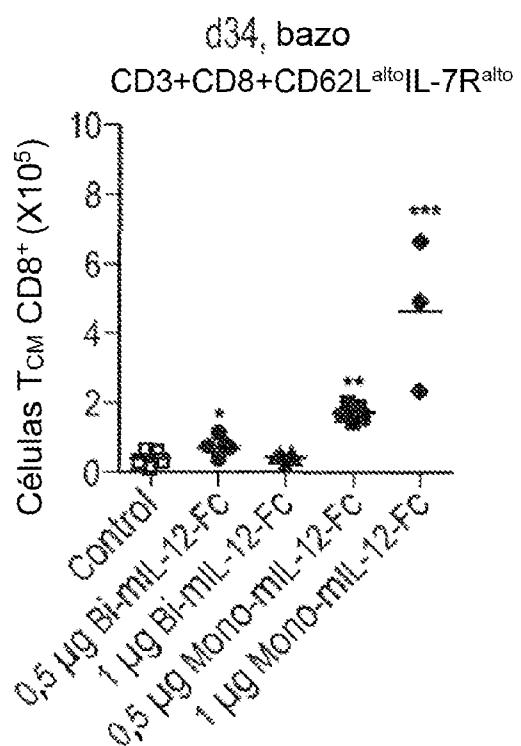


FIGURA 24C

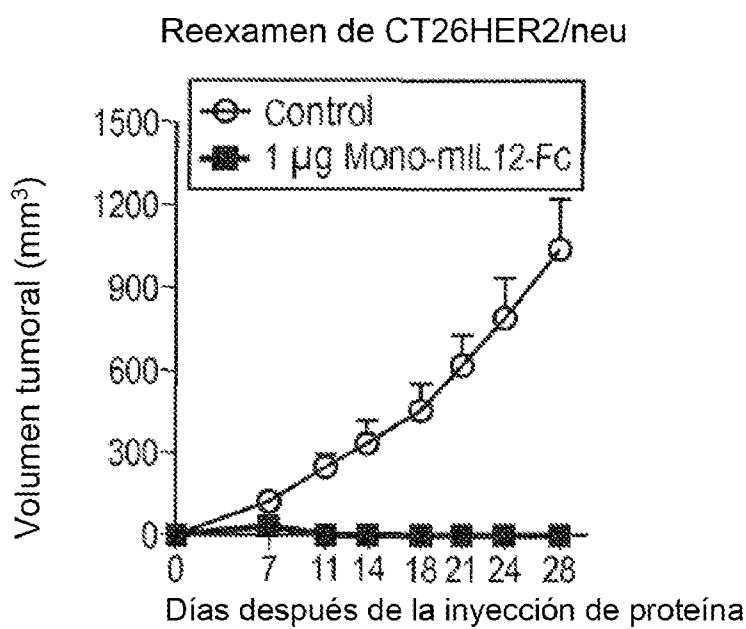


FIGURA 24D

ES 3 000 558 T3

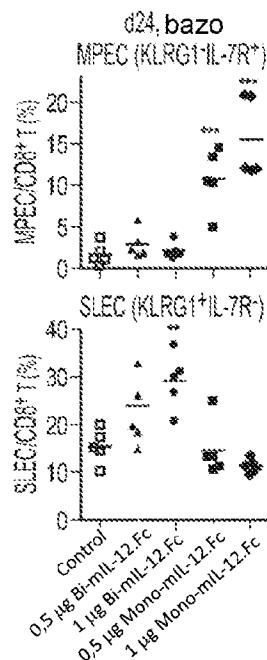
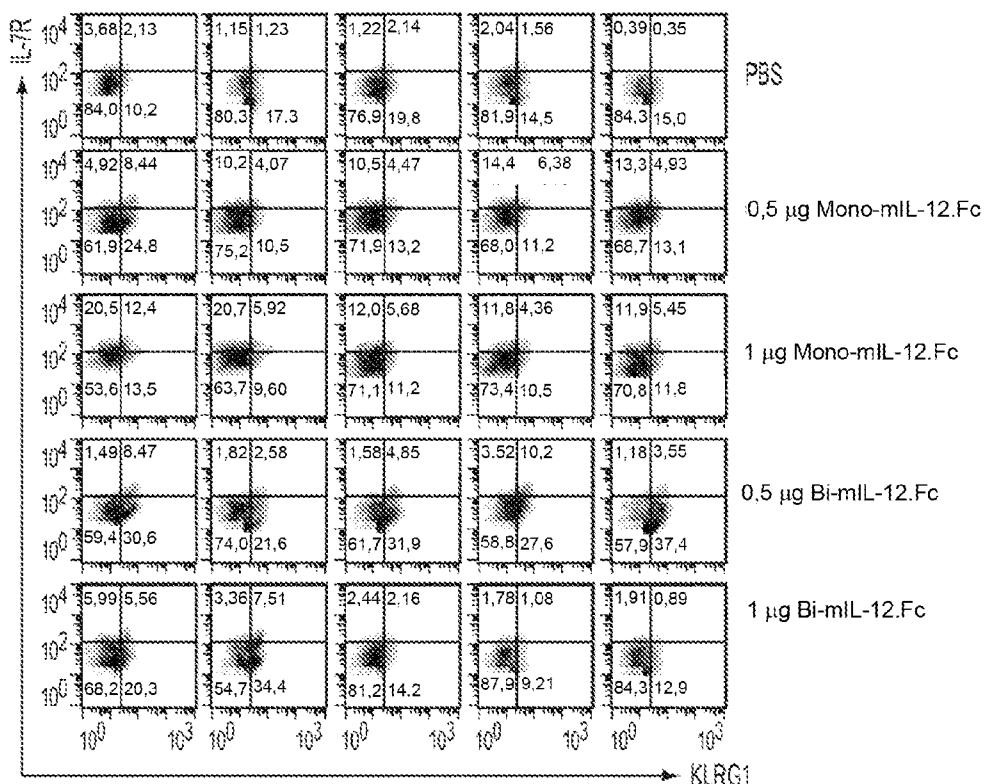


FIGURA 24E

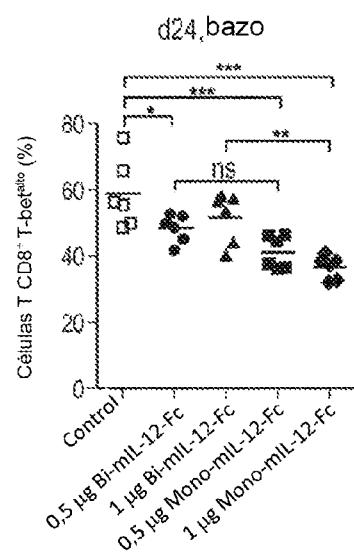


FIGURA 25A

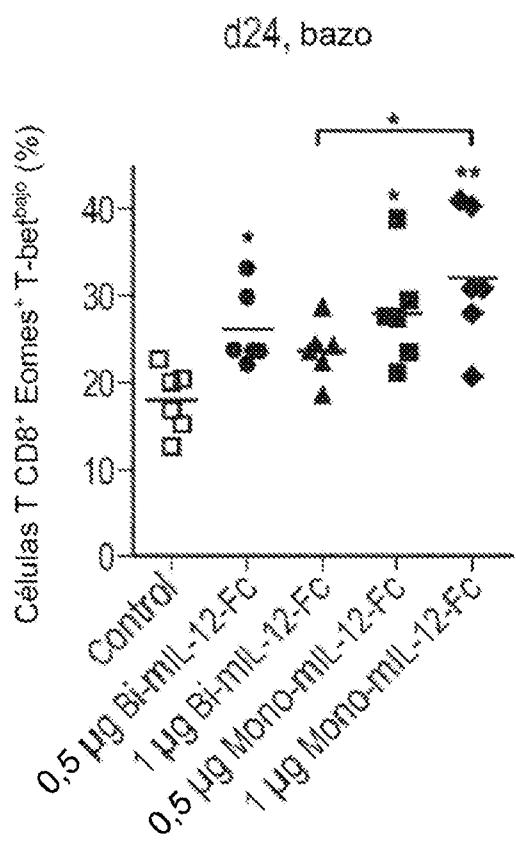


FIGURA 25B

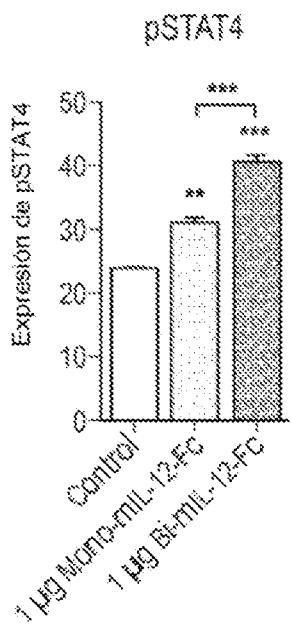


FIGURA 25C

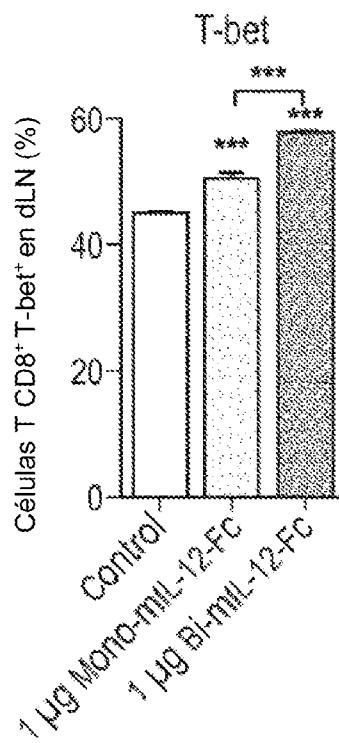


FIGURA 25D

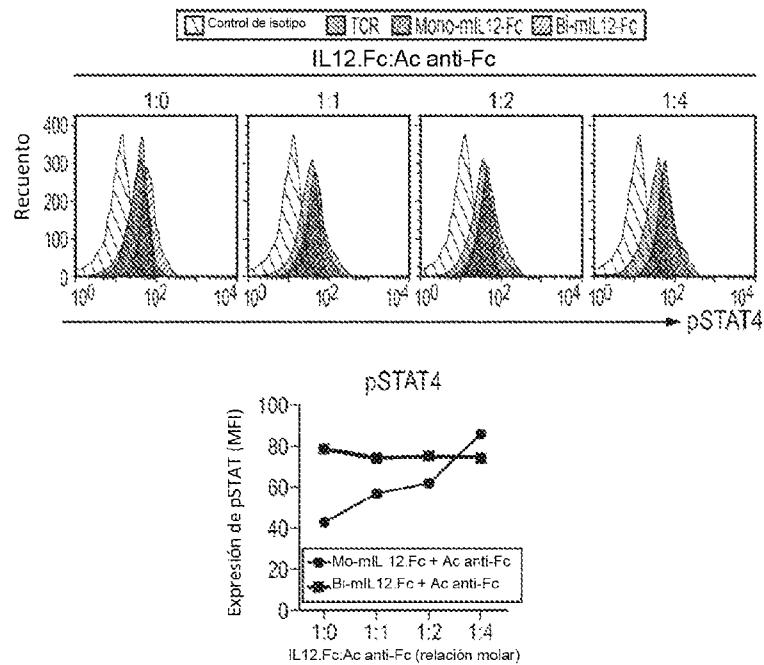


FIGURA 25E

ES 3 000 558 T3

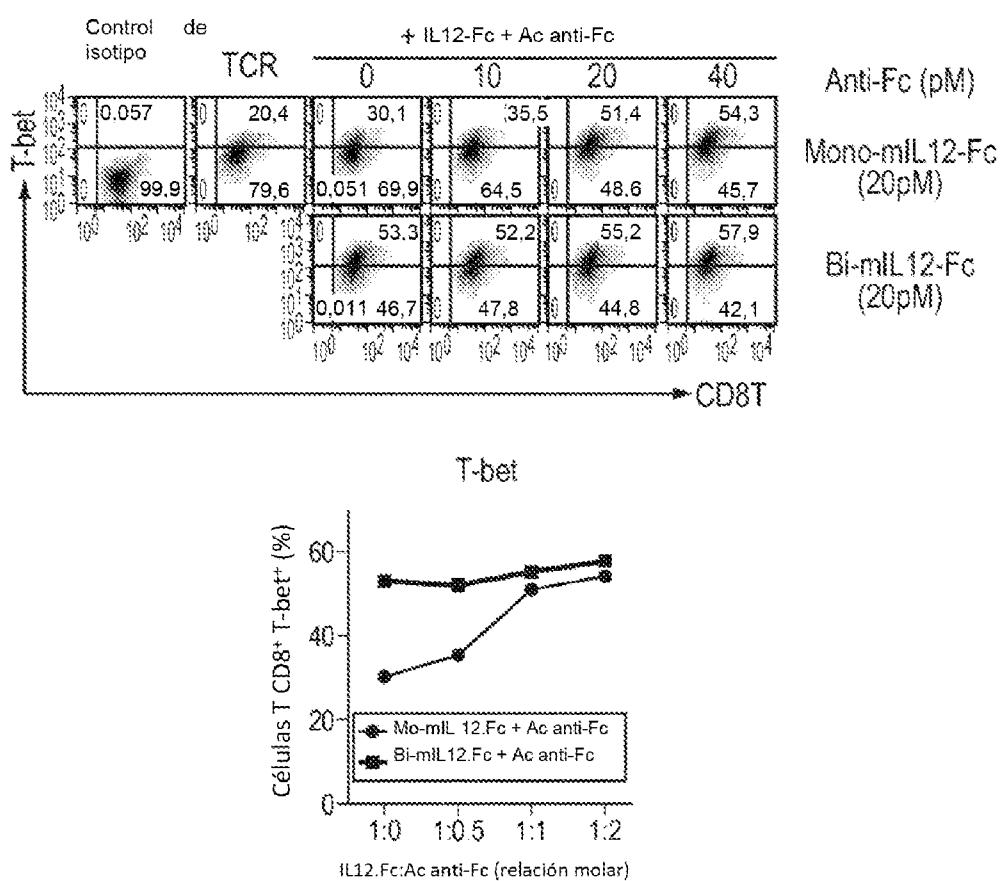


FIGURA 25F

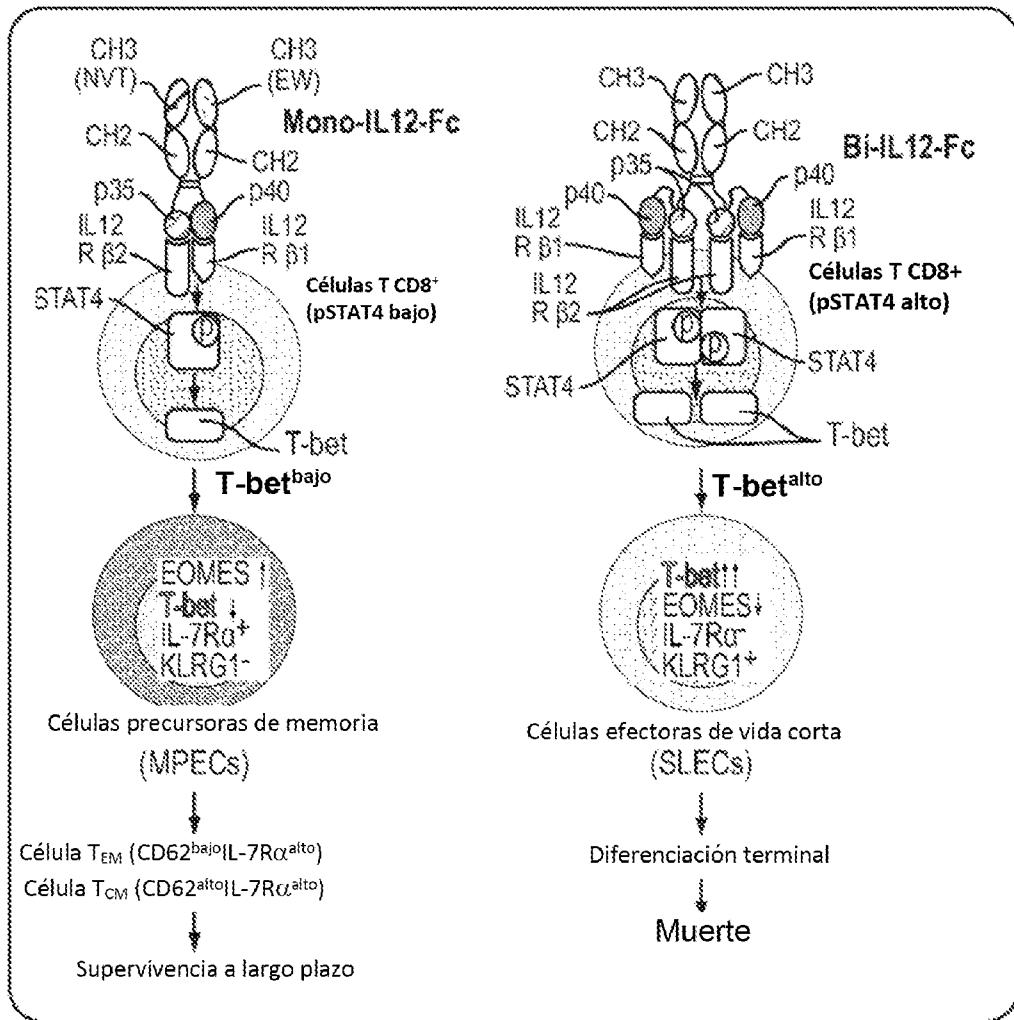


FIGURA 26