(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 704 411**

(51) Int. CI.:

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/US2014/022404**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164427**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14779937 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2970512**

(54) Título: **Proteínas de fusión inmunomoduladoras y procedimientos de fabricación de las mismas**

(30) Prioridad:

12.03.2013 US 201361777016 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2019

(73) Titular/es:

BIOCON LIMITED (100.0%)
20th K.M. Hosur Road Electronics City P.O.
Bangalore 560 100
Karnataka, IN

(72) Inventor/es:

GOVINDAPPA, NAGARAJ;
SOARES, MARIA MELINA y
SASTRY, KEDARNATH

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión inmunomoduladoras y procedimientos de fabricación de las mismas

Antecedentes de la invención

Campo técnico

La presente invención se refiere en general al campo de la generación de proteínas de fusión quiméricas recombinantes para uso en la terapia contra el cáncer, y más específicamente, a moléculas de fusión de Anti-EGFR1-TGFβRII, Anti-EGFR1-PD1 y Anti-CTLA4-PD1 y a procedimientos para generar las mismas, en la que los procedimientos reducen los costes de producción y aumentan la homogeneidad de las proteínas de fusión quiméricas recombinantes.

Técnica relacionada

A pesar de los numerosos avances en la investigación médica, el cáncer sigue siendo la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Los modos tradicionales de atención clínica, tales como la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia, tienen un índice de fracaso significativo, especialmente para tumores sólidos. El fracaso se produce bien porque el tumor inicial no responde, bien por recurrencia debido a un nuevo crecimiento en el sitio original o a metástasis. El cáncer sigue siendo un tema prioritario para la investigación y el desarrollo médico.

La inmunoterapia contra el cáncer se ha explorado durante más de un siglo, pero solo en la última década se han introducido diversos productos basados en anticuerpos en el tratamiento de pacientes con diversas formas de cáncer. En la actualidad, esta es una de las áreas más activas de la investigación clínica, con numerosos productos terapéuticos de anticuerpos ya aprobados en oncología.

El uso de anticuerpos específicos como agentes terapéuticos ofrece ventajas sobre las terapias no dirigidas, como la quimioterapia sistémica mediante la administración oral o intravenosa de fármacos o la radioterapia. Existen dos tipos de terapias basadas en anticuerpos. El tipo más común consiste en identificar un antígeno tumoral (es decir, una proteína expresada en tumores y células cancerosas y no en tejidos normales) y desarrollar un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido al antígeno tumoral. Luego se puede conjugar cualquier agente terapéutico, como un agente quimioterapéutico, un radionúclido, una toxina modificada, etc., a este anticuerpo para lograr una terapia dirigida por el agente terapéutico al tumor. El otro tipo de terapia basada en anticuerpos consiste en proporcionar un anticuerpo que en sí mismo tenga propiedades terapéuticas contra las células tumorales/cancerosas a las que se dirige. La ventaja añadida de esta segunda forma de terapia basada en anticuerpos es que se puede conjugar adicionalmente otro agente terapéutico con el anticuerpo terapéutico para lograr un tratamiento más eficaz. La principal ventaja de cualquier terapia dirigida por anticuerpos y de la terapia con anticuerpos monoclonales (mAb) en particular, es la capacidad de administrar dosis mayores de un agente terapéutico a un tumor, ahorrando más tejido normal de los efectos secundarios del agente terapéutico.

El documento WO 2011/109789 A1 menciona el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos basadas en el desarrollo de proteínas de fusión que comprenden un resto de direccionamiento y un resto inmunomodulador. El documento proporciona estrategias para contrarrestar la tolerancia inmune inducida por el tumor y mejorar la eficacia antitumoral de la quimioterapia mediante la activación y el aprovechamiento de la inmunidad antitumoral adaptativa mediada por células T contra células cancerosas resistentes o diseminadas.

A pesar de la identificación de varios anticuerpos para terapias contra el cáncer, todavía existe la necesidad de identificar productos terapéuticos nuevos y más eficaces para superar la tolerancia inmune y activar las respuestas de las células T. Además, a pesar de que la ingeniería molecular ha mejorado las perspectivas de dichos productos terapéuticos basados en anticuerpos, siguen existiendo problemas en relación con la continuidad de los productos recombinantes generados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de síntesis novedoso y consistente para generar moléculas inmunomoduladoras de fusión recombinantes homogéneas y, más específicamente, polipéptidos quiméricos recombinantes que incluyen anticuerpos de direccionamiento vinculados a proteínas inmunomoduladoras.
Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar una proteína de fusión terapéuticamente activa, en el que la proteína de fusión comprende un resto dirigido al tumor y al menos una molécula inmunomoduladora que contrarresta la tolerancia inmune de una célula cancerosa, en el que el resto dirigido al tumor es una anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4 y en el que la proteína de fusión se prepara mediante las siguientes etapas:

preparar una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión para su expresión en células CHO, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones se modifica para

aumentar las secuencias CG, y en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones es SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo, SEQ ID NO: 2 o 6 para la cadena ligera del anticuerpo, SEQ ID NO: 3 o 7 para la molécula inmunomoduladora, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4, respectivamente, carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo;
clonar la secuencia optimizada de dicha proteína de fusión en las células CHO capaces de expresión transitoria o estable;
cultivar las células CHO en un medio en condiciones adecuadas para el cultivo y que permita que la célula huésped exprese la proteína de fusión; y
recoger proteínas de fusión secretadas y opcionalmente para purificación adicional.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una preparación que comprende proteínas de fusión homogéneas terapéuticamente activas, en la que las proteínas de fusión comprenden un resto dirigido al tumor y al menos una molécula inmunomoduladora, en la que el resto dirigido al tumor es un anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4 y en la que las proteínas de fusión se preparan de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en la que la proteína de fusión tiene una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión para la expresión en células CHO, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones se modifica para aumentar las secuencias de CG y en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones es SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo, SEQ ID NO: 2 o 6 para la cadena ligera del anticuerpo, SEQ ID NO: 3 o 7 para la molécula inmunomoduladora, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4, respectivamente, carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que la cadena pesada y la cadena ligera es SEQ ID NO: 1 y 2 o SEQ ID NO: 5 y 6, en el que el resto diana inmunomodulador es SEQ ID NO: 3 o 7.

En un último aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende las secuencias de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención.

Para mediar una respuesta inmune contra el cáncer, la activación de las células T y la coestimulación son importantes. La coestimulación de las células T está mediada principalmente por el acoplamiento de CD28 con sus ligandos de la familia B7 en células presentadoras de antígenos (APC). Sin embargo, después de la activación, las células T expresan una molécula llamada antígeno linfocítico T citotóxico 4 (CTLA-4), que se une a los ligandos B7 con mucha más afinidad que CD28 y dicha unión modula a la baja la actividad de las células T. Por lo tanto, incluir un anticuerpo que se una al receptor CTLA-4 bloquearía la interacción con los ligandos de la familia B7 y mejoraría la respuesta antitumoral.

El ligando de muerte programada 1 (PDL1), uno de los ligandos B7 analizados anteriormente, obstruye la inmunidad antitumoral (i) tolerando las células T reactivas a tumores mediante la unión a su receptor PD1 (CD279) en las células T; (ii) haciendo que las células tumorales sean resistentes a las células T CD8 + y a la lisis mediada por FasL por medio de la señalización de PD-1 a través de PDL1 expresada en células tumorales; y (iii) promoviendo el desarrollo y mantenimiento de células T reguladoras inducidas. Por lo tanto, PDL1 es un obstáculo importante para la inmunidad antitumoral natural y para las inmunoterapias contra el cáncer que requieren la activación de la inmunidad antitumoral mediada por células T del huésped. Este concepto está respaldado por estudios que demuestran que el bloqueo de anticuerpos de las interacciones PDL1-PD1 mejora la activación de las células T y reduce la progresión del tumor. Aunque los anticuerpos contra PDL1 o PD1 han mostrado eficacia terapéutica en un subconjunto de pacientes con cáncer, la mayoría de los pacientes no se benefician del tratamiento con anticuerpos. Por lo tanto, se necesita un mecanismo para regular la función de PD-L1 que conduzca a un nuevo tratamiento de aplicación universal para minimizar la supresión inmune mediada por PD-L1 en pacientes con cáncer y que sea más eficaz que los mAb disponibles actualmente para PD-1 o PD L1.

Una característica de muchos cánceres epiteliales, tales como los cánceres de colon, cabeza y cuello, mama, ovario, pulmón de células no pequeñas (NSCL, por sus siglas en inglés) y páncreas, son los niveles anormalmente altos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la superficie de las células cancerosas. La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; HER1, HER2/*neu*, HER3 y HER4) incluye receptores de membrana celular con actividad intrínseca de tirosina quinasa que desencadena una cascada de reacciones de señalización biofisiológica en respuesta a la unión de diferentes ligandos. Estos receptores desempeñan un papel clave en el comportamiento de las células malignas en una variedad de tumores humanos, induciendo un aumento de la proliferación, disminuyendo la apoptosis y mejorando la motilidad de las células tumorales y la angiogénesis. Por lo tanto, la presente divulgación incluye anticuerpos dirigidos a miembros de la familia EGFR.

La presente descripción proporciona además procedimientos para reducir el crecimiento de células cancerosas contrarrestando la tolerancia inmune de las células cancerosas, en las que las células T permanecen activas e inhiben el reclutamiento de T reguladores que se sabe que suprimen la respuesta del sistema inmunitario al tumor. Por lo tanto, los polipéptidos quiméricos generados por las secuencias de polinucleótidos de la presente invención

son útiles para tratar el cáncer debido a la fusión expresada o polipéptidos quiméricos.

En un aspecto, la presente invención proporciona una preparación que comprende polipéptidos quiméricos que contienen al menos un resto de direccionamiento para dirigirse a una célula cancerosa y al menos un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmune de una célula cancerosa, en la que el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador están unidos por un espaciador de aminoácidos de una longitud suficiente de residuos de aminoácidos para que ambos grupos puedan unirse con éxito a su diana individual. Como alternativa, el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador que contrarrestan la tolerancia inmune de las células cancerosas pueden unirse directamente entre sí. Los polipéptidos quiméricos/de fusión de la invención son útiles para unirse a un receptor de células cancerosas y reducir la capacidad de las células cancerosas para evitar una respuesta inmune.

El resto de direccionamiento es un anticuerpo que tiene afinidad de unión con CTLA-4 o EGFR1, en el que el anticuerpo se transcribe a partir de una secuencia de polinucleótidos que carece de nucleótidos para la expresión de la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo expresado. Se ha descubierto que al eliminar la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo durante la transcripción, el producto final exhibe una mayor homogeneidad, lo que reduce los costes y la necesidad de una purificación adicional.

Se sabe que durante el procedimiento de transcripción y traducción de una molécula de IgG en células CHO, se expresará la lisina (K) en el extremo C-terminal de la cadena pesada. En el producto comercial, tales lisinas expresadas deben eliminarse para aumentar la pureza. Hay mucha heterogeneidad en el producto producido, tal como se muestra en la Figura 1. Esto ocurre porque la célula CHO tiene una enzima endógena carboxipeptidasa B (CPB) que escindirá la lisina C-terminal siempre que el anticuerpo expresado todavía esté disponible intracelularmente. Sin embargo, esta enzima no escindirá la lisina una vez que el anticuerpo se secrete en el medio. Por lo tanto, la eficiencia de escisión de este CPB endógeno se basa en la disponibilidad dentro de la célula. Como tal, algunos de los anticuerpos se secretarán con la lisina y otros no, y tal combinación causará una heterogeneidad significativa en el producto secretado, habiendo algunos anticuerpos con la lisina C-terminal y otros sin ella. Como el producto recombinante se está utilizando para el uso terapéutico, es necesario purificar hasta la homogeneidad. Por lo tanto, los productos recombinantes del estado de la técnica requieren etapas de purificación adicionales en donde el producto recombinante necesita ser tratado con la enzima CPB primero y purificado una vez más usando una etapa adicional para eliminar cualquier lisina y la enzima CPB del producto final. Estas etapas adicionales agregan un coste significativo al procedimiento de fabricación.

La presente invención evita los inconvenientes de los procedimientos anteriores de sintetizar anticuerpos recombinantes anti-CTLA-4 y anti-EGFR1 al transcribir una proteína expresada a partir de una secuencia de polinucleótidos que carece de nucleótidos para la expresión de la lisina C-terminal en la cadena pesada del anticuerpo expresado.

La presente invención se basa en la preparación de proteínas quiméricas/de fusión mediante la expresión de polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión que contrarrestan o revierten la tolerancia inmune de las células cancerosas. Las células cancerosas pueden escapar a la eliminación mediante agentes quimioterapéuticos o anticuerpos dirigidos al tumor a través de mecanismos inmunosupresores específicos en el microentorno del tumor y dicha capacidad de las células cancerosas se reconoce como tolerancia inmune. Dichos mecanismos inmunosupresores incluyen citocinas inmunosupresoras (por ejemplo, el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)) y las células T reguladoras y/o células dendríticas mieloides inmunosupresoras (DC). Al contrarrestar la tolerancia inmune inducida por el tumor, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos eficaces para el tratamiento del cáncer, opcionales en combinación con otro tratamiento del cáncer existente. El presente documento proporciona estrategias para contrarrestar la tolerancia inmune inducida por tumores y mejorar la eficacia antitumoral de la quimioterapia al activar y potenciar el antitumor adaptativo mediado por células T contra las células cancerosas resistentes o diseminadas.

La presente invención proporciona una preparación que comprende una molécula que incluye al menos un resto de direccionamiento fusionado con al menos un resto inmunomodulador. El resto de direccionamiento se une específicamente a una molécula diana tumoral, y el resto inmunomodulador se une específicamente a una de las siguientes moléculas: (i) Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y (ii) ligando 1 de muerte programada-1 (PD-L1).

El resto de direccionamiento incluye un anticuerpo, que incluye tanto cadenas pesadas como cadenas ligeras, en las que el anticuerpo se une específicamente a un componente de una célula tumoral, antígeno tumoral, vasculatura tumoral, microentorno tumoral o célula inmune infiltrante de tumor. En particular, la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden estar enlazadas individualmente a un resto inmunomodulador del mismo tipo o un resto inmunomodulador separado y distinto. Además, una cadena pesada o ligera de un resto dirigido al anticuerpo puede unirse a un resto inmunomodulador que, a su vez, puede unirse adicionalmente a un segundo resto inmunomodulador en el que haya un enlazador entre los dos restos inmunomoduladores.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido quimérico que comprende un resto dirigido al tumor y un

resto inmunomodulador que comprende una molécula que se une al factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), en el que el resto dirigido al tumor es un anticuerpo que se une a EGFR1, en el que el anticuerpo puede ser el anticuerpo completo, la cadena pesada o la cadena ligera.

En otra descripción, el resto dirigido al tumor puede incluir anticuerpos monoclonales que se dirigen a una célula cancerosa, incluyendo, pero sin limitarse a, cetuximab, trastuzumab, ritubximab, ipilimumab, tremelimumab, muromonab-CD3, abciximab, daclizumab, basiliximab, palivizumab, infliximab. gemtuzumab ozogamicin, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, adalimumab, omalizumab, tositumomab, 1-131 tositumomab, efalizumab, bevacizumab, panitumumab, pertuzumab, natalizumab, etanercept, IGN101 (Aphton), volociximab (Biogen Idec y PDL BioPharm), Anti-CD80 mAb (Biogen Idec), Anti-CD23 mAb (Biogen Idel), CAT-3888 (Cambridge Antibody Technology), CDP-791 (Imclone), eraptuzumab (Immunomedics), MDX-010 (Medarex y BMS), MDX-060 (Medarex), MDX-070 (Medarex), matuzumab (Merck), CP-675,206 (Pfizer), CAL (Roche), SGN-30 (Seattle Genetics), zanolimumab (Serono y Genmab), adecatumumab (Sereno), oregovomab (United Therapeutics), nimotuzumab (YM Bioscience), ABT-874 (Abbott Laboratories), denosumab (Amgen), AM 108 (Amgen), AMG 714 (Amgen), fontolizumab (Biogen Idec y PDL BioPharm), daclizumab (Biogent Idec y PDL BioPharm), golimumab (Centocor y Schering-Plough), CNTO 1275 (Centocor), ocrelizumab (Genetech y Roche), HuMax-CD20 (Genmab), belimumab (HGS y GSK), epratuzumab (Immunomedics), MLN1202 (Millennium Pharmaceuticals), visilizumab (PDL BioPharm), tocilizumab (Roche), ocrerlizumab (Roche), certolizumab pegol (UCB, anteriormente Celltech), eculizumab (Alexion Pharmaceuticals), pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals y Procter & Gamble), abciximab (Centocor), ranibizimumab (Genetech), mepolizumab (GSK), TNX-355 (Tanox) o MYO-029 (Wyeth).

En otra divulgación, el resto dirigido al tumor es un anticuerpo monoclonal que se une a CTLA-4 o EGFR1 generado por los procedimientos de la presente divulgación, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

a. preparar una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión, en la que la secuencia optimizada en codones para el anticuerpo carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de las cadenas pesadas del anticuerpo;
b. clonar la secuencia optimizada de dicha proteína de fusión en una célula huésped capaz de expresión transitoria o continua;
c. cultivar la célula huésped en un medio en condiciones adecuadas para el cultivo y permitir que la célula huésped exprese la proteína de fusión; y
e. recoger las proteínas de fusión secretadas.

En otro aspecto más, el resto inmunomodulador incluye una molécula que se une a TGF-β e inhibe la función del mismo. Específicamente, el resto inmunomodulador incluye un dominio de unión a ligandos extracelulares del receptor del factor de crecimiento transformante TGF-βRII, TGF-βRIIb o TGF-βRIII. En otro aspecto, el resto inmunomodulador incluye un dominio de unión a ligando extracelular (ECD) de TGF-βRII.

En una divulgación adicional, el resto de direccionamiento incluye un anticuerpo que se une específicamente a HER2/neu, EGFR1, CD20 o al antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y en el que el resto inmunomodulador incluye un dominio de unión a ligando extracelular de TGF-βRII.

En otro aspecto más, el resto inmunomodulador incluye una molécula que se une específicamente e inhibe la actividad del ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L 1).

En una divulgación adicional, el resto de direccionamiento incluye un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o polipéptido que se une específicamente a HER2/neu, EGFR1, CD20, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD25 (1L-2a receptor; IL-2aR) o CD4 y en en el que el resto inmunomodulador incluye un dominio de unión a ligando extracelular o ectodominio de muerte programada-1 (PD-1).

En un aspecto adicional, el resto de direccionamiento incluye un anticuerpo que se une específicamente a EGFR1 y CTLA-4, y el resto inmunomodulador incluye una secuencia de interacciones con el factor de crecimiento transformante β (TGF-β).

En un aspecto, la presente divulgación proporciona genes optimizados que codifican un polipéptido de fusión que comprende al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador para tratar el cáncer en un sujeto humano en el que los genes se han optimizado para aumentar la expresión en un sujeto humano y/o en células.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector que comprende genes optimizados para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano en el que los genes optimizados se han modificado para aumentar las secuencias de CG. Preferiblemente, el vector incluye secuencias de nucleótidos para codificar al menos un resto de direccionamiento, al menos un resto inmunomodulador y un resto de enlace, en donde las secuencias de nucleótidos optimizadas se seleccionan de SEQ ID NO: 1 a 7, tal como se muestra en la Figura 2.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un

sujeto, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar al menos un vector recombinante que comprende secuencias de nucleótidos que codifican al menos un resto de direccionamiento, al menos un resto inmunomodulador y un resto de enlace situado entre el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador, en el que las secuencias de nucleótidos se seleccionan de SEQ ID NO: 1 a 7; y
administrar el vector recombinante al sujeto en condiciones tales que dichas secuencias de nucleótidos se expresen a un nivel que produzca una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión codificadas en el sujeto.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona una célula huésped recombinante transfectada con una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de proteína de fusión de la presente divulgación, en el que las secuencias de polinucleótidos se seleccionan de SEQ ID NO: 1 a 7.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación contempla un procedimiento de preparación de una proteína de fusión quimérica del presente documento que comprende:

transfectar una célula huésped con una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión quimérica para producir una célula huésped transformada, en la que la secuencia de polinucleótidos codifica al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador, en la que la secuencia de polinucleótidos comprende una combinación de secuencias seleccionadas de SEQ ID NO: 1 a 7; y
mantener la célula huésped transformada en condiciones biológicas suficientes para la expresión de la proteína de fusión quimérica.

En otro aspecto, se divulga el uso de una proteína de fusión quimérica, en la que la proteína de fusión quimérica comprende el enlazador PD1 anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11); anti-EGFR1-enlazador-TGFβRII (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 12); Anti-CTLA-4-enblazador-PD1 (SEQ ID NO: 13, 14, 10 y 11), tal como se muestra en las Figuras 3, 4 y 5, respectivamente, en el uso de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, la proteína de fusión se expresa en una célula huésped y tales proteínas expresadas se administran en una cantidad terapéutica para reducir los efectos del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto adicional, se divulga un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neoplásica. El procedimiento incluye la administración a un sujeto que lo necesite de una o más proteínas de fusión del presente documento, en diversos aspectos, al sujeto se le administra una o más proteínas de fusión del presente documento en combinación con otra terapia contra el cáncer. En un aspecto, la terapia contra el cáncer incluye una molécula quimioterapéutica, un anticuerpo, un inhibidor de quinasa de molécula pequeña, un agente hormonal o un agente citotóxico. La terapia contra el cáncer también puede incluir radiación ionizante, radiación ultravioleta, crioablación, ablación térmica o ablación por radiofrecuencia.

Las proteínas de fusión de anticuerpo-péptido terapéuticamente activas de la invención son un anticuerpo dirigido fusionado a uno o más restos inmunomoduladores que contrarrestan la tolerancia inmune de una célula cancerosa. En un aspecto, el resto inmunomodulador puede estar unido por un espaciador de aminoácidos de longitud suficiente para permitir la unión biespecífica de la molécula. El resto inmunomodulador puede estar unido al extremo N o al extremo C de la cadena pesada o al extremo N o al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo.

El procedimiento de la presente divulgación proporciona secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de fusión de anticuerpo-péptido terapéuticamente activas y dicha expresión se puede llevar a cabo en una línea celular transitoria o una línea celular estable. La expresión transitoria se realiza mediante la transfección o transformación de la célula huésped con vectores que portan las proteínas de fusión codificadas a células huésped de mamíferos.

Una vez expresados los péptidos de fusión, se someten preferiblemente a purificación y a pruebas *in vitro* para comprobar su biespecificidad, es decir, comprobar que tienen la capacidad de unirse tanto al resto diana como al resto inmunomodulador. Dichas pruebas pueden incluir pruebas *in vitro* tales como ELISA o ensayos de unión a células NK/T para validar la unión de dianas bifuncionales o la estimulación de células inmunitarias.

En particular, una vez que los péptidos de fusión específicos divulgados demuestran la biespecificidad deseada, las secuencias de polinucleótidos que codifican dichos péptidos de fusión se seleccionan para subclonarse en una línea celular estable para su expresión y purificación a mayor escala. Tales líneas celulares estables se describen previamente, tales como una línea celular de mamífero, que incluye, pero no se limita a, HEK293, CHO o NSO.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inhibir y/o reducir la unión de PDL1 a PD1, aumentando así la respuesta inmune contra las células tumorales, comprendiendo el procedimiento:

a. proporcionar un polipéptido quimérico que comprende PD1 y un anticuerpo anti-EGFR1 o anti-CTLA-4; y
b. poner en contacto una célula tumoral con el polipéptido quimérico en el que el polipéptido quimérico se une con al menos PDL1 de la célula tumoral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar proteínas de fusión de anticuerpo-péptido terapéuticamente activas, en el que la proteína de fusión comprende un resto dirigido al tumor y al menos una molécula inmunomoduladora que contrarresta la tolerancia inmune de una célula cancerosa, en el que el resto dirigido al tumor es un anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4 y en el que la proteína de fusión se prepara mediante las siguientes etapas:

a. preparar una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión para su expresión en células CHO, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones se modifica para aumentar las secuencias CG, y en la que la secuencia de nucleótido optimizada en codones es SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo, SEQ ID NO: 2 o 6 para la cadena ligera del anticuerpo, SEQ ID NO: 3 o 7 para la molécula inmunomoduladora, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4, respectivamente, carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de las cadenas pesadas del anticuerpo;
b. clonar la secuencia optimizada de dicha proteína de fusión en las células CHO capaces de expresión transitoria o estable;
c. cultivar las células CHO en un medio en condiciones adecuadas para el cultivo y permitir que la célula huésped exprese la proteína de fusión; y
d. recoger proteínas de fusión secretadas.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión quimérica comprende al menos un resto de direccionamiento que tiene afinidad por una célula cancerosa y al menos un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmune de la célula cancerosa, en la que el resto un resto de direccionamiento es un anticuerpo y la secuencia de ácido nucleico del resto un resto de direccionamiento carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de las cadenas pesadas del anticuerpo. La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo incluye preferiblemente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5. La secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión quiméricas comprende preferiblemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 7; SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4; y SEQ ID NO: 5, 6, 3 y 4.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

a) preparar una proteína de fusión terapéuticamente activa, en la que la proteína de fusión comprende un resto dirigido al tumor y al menos una molécula inmunomoduladora, en el que el resto dirigido al tumor es un anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4 y en el que la proteína de fusión se prepara por las siguientes etapas:
preparar una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones para el anticuerpo carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de las cadenas pesadas del anticuerpo;

a) ii) clonar la secuencia optimizada de dicha proteína de fusión en una célula huésped capaz de expresión transitoria o continua;
b) iii) hacer crecer la célula huésped en un medio en condiciones adecuadas para el crecimiento y permitir que la célula huésped exprese la proteína de fusión; y
c) iv) recoger proteínas de fusión secretadas;

b. b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente activa de las proteínas de fusión secretadas.

La proteína de fusión se selecciona del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en las SEQ ID NO: 15 y 9; SEQ ID NO: 8 y 16; SEQ ID NO: 17 y 9; SEQ ID NO: 8 y 18; SEQ ID NO: 27 y 9; SEQ ID NO: 8 y 28; SEQ ID NO: 29 y 9; SEQ ID NO: 8 y 30; SEQ ID NO: 31 y 28; SEQ ID NO: 31 y 30; SEQ ID NO: 29 y 28; SEQ ID NO: 29 y 30; SEQ ID NO: 32 y 14; SEQ ID NO: 13 y 33; SEQ ID NO: 34 y 14; SEQ ID NO: 13 y 35; SEQ ID NO: 32 y 33; SEQ ID NO: 32 y 35; SEQ ID NO: 34 y 33 y SEQ ID NO: 34 y 35.

En otro aspecto, se divulga un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite de una o más proteínas de fusión codificadas por al menos una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 7; SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 y SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 4. En particular, al usar las secuencias de polinucleótidos definidas anteriormente, se puede expresar la siguiente combinación de proteínas de fusión, incluido el enlazador anti-EGFR1 PD1 (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11); anti-EGFR1-enlazador-TGFβRII (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 12); y Anti-CTLA-4-enlazador-PD1 (SEQ ID NO: 13, 14, 10 y 11).

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y reivindicaciones,

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las diferentes posibilidades de colocación de la lisina en una cadena pesada y la necesidad de proporcionar purificación que causa dicha heterogeneidad.

La Figura 2 muestra las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones utilizadas para la expresión de las proteínas de fusión anticuerpo-péptido de la presente invención, incluida la cadena pesada Anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 1); cadena ligera anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 2); PD1 (SEQ ID NO: 7); enlazador (SEQ ID NO: 4); cadena pesada anti-CTLA-4 (SEQ ID NO: 5); cadena ligera anti-CTLA-4 (SEQ ID NO: 6) y TGFβRII (SEQ ID NO: 3).´

La Figura 3 muestra los residuos de aminoácidos para el constructo de PD1 de enlazador anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11).

La Figura 4 muestra los residuos de aminoácidos para el constructo anti-EGFR1-enlazador-TGFβRII (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 12).

La Figura 5 muestra los residuos de aminoácidos para el anti-CTLA-4-enlazador-PD1 (SEQ ID NO: 13, 14, 10 y 11).

La Figura 6 muestra las diferentes posibilidades de colocación de la molécula PD1 en el anticuerpo anti-EGFR1 para FMab5, FMab6, FMab7 y FMab8.

La Figura 7 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC-PD1 + Anti-EGFR1 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo C de la cadena pesada separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 15 y 9.

La Figura 8 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC-PD1 en donde la molécula PD1 está conectada al extremo C de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 8 y 16.

La Figura 9 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -PD1 en las que la molécula PD1 está conectada al extremo N de la cadena pesada separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 17 y 9.

La Figura 10 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC + PD1-Anti-EGFR1 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo N de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 8 y 18.

La Figura 11 muestra los constructos de expresión desarrolladas utilizando los ADNc como se establece en SEQ ID NO: 1, 2 y 7.

La Figura 12 muestra las diferentes posibilidades de colocación de la molécula TGFβRII en el anticuerpo anti-EGFR1, FMab1, FMab2, FMab3, FMab4, FMab9, FMab10, FMab11 y FMab12.

La Figura 13 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo C de la cadena pesada separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 27 y 9.

La Figura 14 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo C de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 8 y 28.

La Figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos para TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo N de la cadena pesada separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 29 y 9.

La Figura 16 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo N de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 8 y 30.

La Figura 17 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo C de la cadena pesada y ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 31 y 28.

La Figura 18 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo C de la cadena pesada y al extremo N de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 31 y 30.

La Figura 19 muestra las secuencias de aminoácidos para TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo N de la cadena pesada y al extremo C de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 29 y 28.

La Figura 20 muestra las secuencias de aminoácidos para TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC en las que la molécula de TGFβRII está conectada al extremo N de la cadena pesada y al extremo N de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 29 y 30.

La Figura 21 muestra constructos de expresión desarrolladas utilizando los ADNc como se establece en SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

La Figura 22 muestra las muestras purificadas con ProteinA analizadas en SDS-PAGE reductora al 12 %.

La Figura 23 muestra muestras purificadas con ProteinA analizadas en SDS-PAGE no reductora al 6 %.

La Figura 24 muestra las diferentes posibilidades de colocación de la molécula PD1 en el anticuerpo anti-CTLA4.

La Figura 25 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo C de la cadena pesada separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 32 y 14.

La Figura 26 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1 en las que la molécula PD1 está conectada al extremo C de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 13 y 33.

La Figura 27 muestra las secuencias de aminoácidos para PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo N de la cadena pesada separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 34 y 14.

La Figura 28 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo N de la cadena ligera separada por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 13 y 35.

La Figura 29 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC-PD1 en las que la molécula PD1 está conectada al extremo C de la cadena pesada y la cadena ligera separadas por un enlazador e incluyendo SEQ ID NO: 32 y 33.

La Figura 30 muestra las secuencias de aminoácidos para Anti-CTLA4 HC-PD1 + PD1-Anti-CTLA4 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo C de la cadena pesada separada por un enlazador y al extremo N de la cadena ligera, incluyendo SEQ ID NO: 32 y 35.

La Figura 31 muestra las secuencias de aminoácidos para PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1 en las que la molécula PD1 está conectada al extremo N de la cadena pesada separada por un enlazador y al extremo C de la cadena ligera, incluyendo SEQ ID NO: 34 y 33.

La Figura 32 muestra las secuencias de aminoácidos para PD1-Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC en las que la molécula PD1 está conectada al extremo N de la cadena pesada separada por un enlazador y al extremo N de la cadena ligera, incluyendo SEQ ID NO: 34 y 35.

La Figura 33 muestra las constructos de expresión desarrolladas utilizando los ADNc como se establece en SEQ ID NO: 7, 5 y 6.

La Figura 34 muestra el ELISA de unión a diana de EGFR1. Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + LC anti-EGFR1 se une a su diana EGFR1 inmovilizada.

La Figura 35 muestra el ELISA de unión a diana de TGFβ. Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + LC anti-EGFR1 se une a su TGFβ diana.

La Figura 36 muestra ELISA bifuncional. El Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC se une a su diana EGFR1 y TGFβ al mismo tiempo.

La Figura 37 muestra el análisis citométrico de flujo de la unión del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC a células A431 que expresan EGFR1.

La Figura 38 muestra ADCC contra células A-431 que expresan EGFR1. Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII

+ Anti-EGFR1 LC media la ADCC contra las células A-431 que expresan EGFR1 y el efecto depende de la dosis.

La Figura 39 muestra el ensayo de inhibición de la proliferación. Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC inhibe la proliferación de células A-431 que expresan EGFR1.

La Figura 40 muestra el ELISA de unión a diana EGFR1. Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC-TGFβRII se une a su diana EGFR1 inmovilizada.

La Figura 41 muestra el ELISA de unión a diana de TGFβ. Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII se une a su diana TGFβ.

La Figura 42 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC-TGFβRII se une a su diana EGFR1 y TGFβ al mismo tiempo.

La Figura 43 muestra el ensayo de inhibición de la proliferación. Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII inhibe la proliferación de las células A-431 que expresan EGFR1.

La Figura 44 muestra ELISA de unión a diana EGFR1. Mb de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC se une a su diana inmovilizada EGFR1.

La Figura 45 muestra el ELISA de unión a diana de TGFβ. Mab de fusión TGFpRII-anti-EGFR1 HC + anti-EGFR1 LC se une a su diana TGFβ.

La Figura 46 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC se une a su diana EGFR1 y TGFβ al mismo tiempo.

La Figura 47 muestra el ensayo de inhibición de la proliferación. Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC inhibe la proliferación de EGFR1 que expresan las células A-431.

La Figura 48 muestra el ELISA de unión a diana EGFR1. Mab de fusión anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana inmovilizada EGFR1.

La Figura 49 muestra el ELISA de unión a diana de TGFβ. Mab de fusión anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana TGFβ.

La Figura 50 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana EGFR1 y TGFβ al mismo tiempo.

La Figura 51 muestra el análisis por citometría de flujo de la unión del Mab de fusión Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC a células A431 que expresan EGFR1.

La Figura 52 muestra el ELISA de unión a diana EGFR1. Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 se une a su diana inmovilizada EGFR1.

La Figura 53 muestra el ELISA de unión a diana de TGFβ. Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 se une a su diana TGFβ.

La Figura 54 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana EGFR1 y TGFβ al mismo tiempo.

La Figura 55 muestra el ELISA de unión a diana EGFR1. Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana inmovilizada EGFR1.

La Figura 56 muestra el ELISA de unión a diana de TGFβ. Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana TGFβ.

La Figura 57 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a su diana EGFR1 y TGFβ al mismo tiempo.

La Figura 58 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC se une a su diana CTLA4 y PDL1 al mismo tiempo.

La Figura 59 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1 se une a su diana CTLA4 y PDL1 al mismo tiempo.

La Figura 60 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC se une a su diana

CTLA4 y PDL1 al mismo tiempo.

La Figura 61 muestra ELISA bifuncional. Los Mab de fusión Anti-CTLA4 HC-PD1 + PD1-Anti-CTLA4 LC-PD1, Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC-PD1 y Anti-CTLA4 HC-PD1 + PD1-Anti-CTLA4 LC se unen a sus dianas CTLA4 y PDL1 al mismo tiempo.

La Figura 62 muestra ELISA bifuncional. Los Mab de fusión PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1 y PD1-Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC se unen a sus dianas CTLA4 y PDL1 al mismo tiempo.

La Figura 63 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión Anti-EGFR1 HC-PD1 + Anti-EGFR1 LC se une a su diana EGFR y PDL1 al mismo tiempo.

La Figura 64 muestra ELISA bifuncional. Mab de fusión Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC-PD1 se une a su diana EGFR y PDL1 al mismo tiempo.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la invención y proporcionar una comprensión de los diversos elementos y constituyentes utilizados en la fabricación y el uso de la presente invención, los siguientes términos usados en la descripción tienen los siguientes significados.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido”, “proteína” y “péptido” se usan indistintamente para denotar una secuencia de polímero de al menos dos aminoácidos unidos covalentemente por un enlace amida, independientemente de la longitud o la modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, lipidación, miristilación, ubiquitinación, etc.). También se incluyen los aminoácidos D y L, y las mezclas de los aminoácidos D y L.

El término polipéptido quimérico se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene dos o más partes que generalmente no se encuentran juntas en una secuencia de aminoácidos en la naturaleza.

El término “espaciador/enlazador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que conecta dos unidades de proteínas monoméricas para formar una molécula quimérica y todavía permite la unión de las partes a los receptores deseados. Los ejemplos particulares de espaciadores/enlazadores pueden incluir un espaciador de aminoácidos, en el que la secuencia de aminoácidos puede ser esencialmente de cualquier longitud, por ejemplo, tan poco como 5 o tanto como 200 o más preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 residuos de aminoácidos.

El término “terapéutico”, tal como se usa en el presente documento, significa un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos de patología con el propósito de disminuir o eliminar esos signos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, significa una cantidad de la proteína quimérica que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso para el sujeto al que se administra la proteína quimérica.

Otro ejemplo de una modificación es la adición de un dominio heterólogo que imparte una funcionalidad distinta sobre el polipéptido quimérico. Un dominio heterólogo puede ser cualquier molécula pequeña inorgánica u orgánica o macromolécula, siempre que imparta una función adicional. Ejemplos particulares de dominios heterólogos que imparten una función distinta incluyen una secuencia de aminoácidos que imparte direccionamiento (por ejemplo, ligando receptor, anticuerpo, etc.), función inmunopotenciadora (por ejemplo, inmunoglobulina, un adyuvante), permite la purificación, aislamiento o detección (por ejemplo, myc, etiqueta T7, polihistidina, avidina, biotina, lectinas, etc.).

Tal como se ejemplifica en el presente documento, las secuencias polipeptídicas pueden incluir sustituciones, variaciones o derivatizaciones de la secuencia de aminoácidos de una o ambas secuencias polipeptídicas que comprenden el polipéptido quimérico, siempre que el polipéptido quimérico modificado tenga sustancialmente la misma actividad o función que el polipéptido quimérico no modificado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente la misma actividad o función”, cuando se usa en referencia a un polipéptido quimérico así modificado, significa que el polipéptido conserva la mayor parte, toda o más de la actividad asociada con el polipéptido no modificado, tal como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica.

Los polipéptidos quiméricos modificados que son “activos” o “funcionales” incluidos en el presente documento pueden identificarse mediante un ensayo funcional de rutina. Por ejemplo, al usar ensayos de unión de anticuerpos o ensayos de unión de co-receptores, se puede determinar fácilmente si el polipéptido quimérico modificado tiene actividad. Como los polipéptidos quiméricos modificados conservarán la actividad o función asociada con un

polipéptido quimérico no modificado, los polipéptidos quiméricos modificados generalmente tendrán una secuencia de aminoácidos “sustancialmente idéntica” o “sustancialmente homóloga” con la secuencia de aminoácidos del polipéptido no modificado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente idéntico” o “sustancialmente homólogo”, cuando se usa en referencia a una secuencia polipeptídica, significa que una secuencia del polipéptido es al menos un 50 % idéntica a una secuencia de referencia. Los polipéptidos modificados y polipéptidos sustancialmente idénticos tendrán generalmente al menos un 70 %, alternativamente un 85 %, más probablemente un 90 %, y más probablemente un 95 % de homología con un polipéptido de referencia.

Tal como se expone en el presente documento, los polipéptidos sustancialmente idénticos u homólogos incluyen adiciones, truncamientos, deleciones o inserciones internas, sustituciones conservativas y no conservativas, u otras modificaciones localizadas en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no destruyen la función del polipéptido quimérico (según se determina mediante ensayos funcionales, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento). Un ejemplo particular de una sustitución es cuando uno o más aminoácidos son reemplazados por otro residuo químicamente o biológicamente similar. Tal como se usa en el presente documento, el término “sustitución conservativa” se refiere a una sustitución de un residuo con un residuo químicamente o biológicamente similar. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, el ácido aspártico por glutámico o la asparagina por glutamina, y similares. Los expertos en la materia reconocerán los numerosos aminoácidos que pueden modificarse o sustituirse con otros residuos químicamente similares sin alterar sustancialmente la actividad.

Los polipéptidos modificados incluyen además “derivados químicos”, en los que uno o más de los aminoácidos que contienen tienen una cadena lateral químicamente alterada o derivatizada. Tales polipéptidos derivatizados incluyen, por ejemplo, aminoácidos en los que los grupos amino libres forman hidrocloruros de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carobenzoxi; los grupos carboxi libres forman sales, metil y etil ésteres; los grupos hidroxilo libres forman derivados O-acilo u O-alquilo, así como derivados de aminoácidos de origen natural, por ejemplo, 4-hidroxiprolina para la prolina, 5-hidroxilisina para la lisina, homoserina para la serina, ornitina para la lisina, etc. También se incluyen D-aminoácidos y derivados de aminoácidos que pueden alterar el enlace covalente, por ejemplo, el enlace disulfuro que se forma entre dos residuos de cisteína que produce un polipéptido ciclado.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “aislado” o “sustancialmente puro”, cuando se usan como modificadores de polipéptidos quiméricos, fragmentos de secuencia de los mismos y polinucleótidos, significa que se producen por intervención humana y se separan de su .
entorno celular *in vivo* nativo. En general, los polipéptidos y polinucleótidos así separados están sustancialmente libres de otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que están asociados de forma natural.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden prepararse mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la materia. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, aislamiento y purificación de tejidos que se sabe que contienen ese polipéptido, y expresión de ADN clonado que codifica dicho polipéptido utilizando células transformadas. Los polipéptidos quiméricos pueden obtenerse mediante la expresión de un polinucleótido que codifica el polipéptido en una célula huésped, tal como una bacteria, una levadura o una célula de mamífero, y purificando el polipéptido quimérico expresado mediante purificación utilizando procedimientos bioquímicos habituales (por ejemplo, purificación por inmunoafinidad, purificación en gel, detección de expresión, etc.). Otros procedimientos bien conocidos se describen en Deutscher y col., 1990. De manera alternativa, el polipéptido quimérico puede sintetizarse químicamente. La pureza se puede medir mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción del gel (por ejemplo, tinción con plata) o mediante análisis por HPLC.

La presente divulgación proporciona, además, secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos quiméricos, fragmentos de los mismos y secuencias complementarias. Tal como se usa en el presente documento, los términos “ácido nucleico”, “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “cebador” se usan indistintamente para referirse al ácido desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN), ya sea de cadena doble o simple, lineal o circular. El ARN puede ser ARNm, ARNr, ARNt o ARNi antisentido sin empalmes o empalmados. El ADN puede ser ADN complementario (ADNc), ADN genómico o un antisentido. Se incluyen específicamente análogos y derivados de nucleótidos, tales como aquellos que son resistentes a la degradación de las nucleasas, que pueden funcionar para codificar un polipéptido quimérico de la invención. Los oligonucleótidos y polinucleótidos resistentes a las nucleasas son particularmente útiles para las vacunas de ácido nucleico descritas en el presente documento.

Un polinucleótido “aislado” o “sustancialmente puro” significa que el ácido nucleico no es inmediatamente contiguo a las secuencias codificantes con el extremo 5' o el extremo 3' con los que es inmediatamente contiguo en el genoma natural del organismo del que se deriva. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o el tratamiento de endonucleasa de restricción producido durante la clonación), así como un ADN recombinante incorporado en un vector, un plásmido o

virus de replicación autónoma, o un ADN genómico de un procariota o eucariota.
Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención se pueden obtener usando técnicas estándar conocidas en la materia (por ejemplo, clonación molecular, síntesis química) y la pureza se puede determinar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, análisis de secuenciación y similares. Los polinucleótidos también pueden aislarse utilizando técnicas de hibridación o basadas en ordenador que son bien conocidas en la materia. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a: (1) hibridación de bibliotecas de ADN genómico o ADNc con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogos; (2) detección de anticuerpos de polipéptidos expresados por secuencias de ADN (por ejemplo, utilizando una biblioteca de expresión); (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico o ADNc usando cebadores capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas por ordenador de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) selección diferencial de una biblioteca de ácidos nucleicos sustraída.

La invención también incluye polinucleótidos sustancialmente homólogos. Tal como se usa en el presente documento, el término “homólogo”, cuando se usa en referencia a una molécula de ácido nucleico, se refiere a la similitud entre dos secuencias de nucleótidos. Cuando una posición de nucleótido en ambas moléculas está ocupada por nucleótidos idénticos, entonces son homólogos en esa posición. Las secuencias de ácido nucleico “sustancialmente homólogas” son al menos un 50 % homólogas, más probablemente al menos un 75 % homólogas y muy probablemente un 90 % o más homólogas. Al igual que con los polipéptidos quiméricos sustancialmente homólogos, los polinucleótidos sustancialmente homólogos de los polinucleótidos que codifican polipéptidos quiméricos, codifican polipéptidos que retienen la mayor parte o la totalidad de la actividad o función asociada con la secuencia con la que es homólogo. Para los polinucleótidos, la duración de la comparación entre secuencias generalmente será de al menos 30 nucleótidos, alternativamente al menos 50 nucleótidos, más probablemente al menos 75 nucleótidos, y muy probablemente 110 nucleótidos o más. Los algoritmos para identificar secuencias homólogas que tienen en cuenta los vacíos/brechas en la secuencia de polinucleótidos y oligonucleótidos no coincidentes son conocidos en la técnica, como BLAST (véase Altschul, 1990).

Los polinucleótidos de la presente invención pueden, si se desea: estar desnudos o estar en un portador adecuado para pasar a través de una membrana celular (por ejemplo, complejo de polinucleótido-liposoma o un sistema de dispersión coloidal), contenido en un vector (por ejemplo, vector de retrovirus, vectores adenovirales, y similares), unidos a perlas inertes u otros dominios heterólogos (por ejemplo, anticuerpos, ligandos, biotina, estreptavidina, lectinas y similares), u otras composiciones apropiadas divulgadas en el presente documento o conocidas en la técnica. Por lo tanto, se pueden lograr, y se contemplan, medios virales y no virales de administración de polinucleótidos. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden contener secuencias de ácido nucleico adicionales unidas a los mismos que codifican un polipéptido que tiene una funcionalidad distinta, tal como los diversos dominios heterólogos expuestos en el presente documento.

Los polinucleótidos de la presente invención también pueden modificarse, por ejemplo, para ser resistentes a las nucleasas y mejorar su estabilidad en una formulación farmacéutica. Los polinucleótidos descritos son útiles para codificar polipéptidos quiméricos de la presente invención, especialmente cuando dichos polinucleótidos se incorporan a sistemas de expresión descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. Por consiguiente, también se incluyen polinucleótidos que incluyen un vector de expresión.

Para la propagación o expresión en células, los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden insertarse en un vector. El término “vector” se refiere a un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que puede manipularse mediante la inserción o incorporación de un ácido nucleico. Dichos vectores pueden usarse para manipulación genética (es decir, “vectores de clonación”) o pueden usarse para transcribir o traducir el polinucleótido insertado (es decir, “vectores de expresión”). Un vector generalmente contiene al menos un origen de replicación para la propagación en una célula y un promotor. Se incluyen elementos de control, incluidos los promotores presentes en un vector de expresión, para facilitar la transcripción y la traducción adecuadas (por ejemplo, la señal de empalme para los intrones, el mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción en el marco del ARNm y los codones de parada). La expresión *in vivo* o *in vitro* de los polinucleótidos descritos en el presente documento puede ser conferida por un promotor unido operativamente al ácido nucleico.

“Promotor” se refiere a una secuencia mínima de ácido nucleico suficiente para dirigir la transcripción del ácido nucleico al que el promotor está unido operativamente (véase Bitter 1987). Los promotores pueden realizar la transcripción de forma constitutiva directa, pueden ser específicos de tejido o pueden realizar transcripción inducible o reprimible; dichos elementos generalmente se ubican en las regiones 5' o 3' del gen así regulado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “unido operativamente” significa que un polinucleótido seleccionado (por ejemplo, codificando un polipéptido quimérico) y una secuencia o varias secuencias reguladoras se conectan de tal manera que permiten la transcripción cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, las proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a la(s) secuencia(s) reguladora(s). Normalmente, un promotor está ubicado en el extremo 5' del polinucleótido y puede estar muy cerca del sitio de inicio de la transcripción para permitir que el promotor regule la expresión del polinucleótido.

Cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores constitutivos, como T7 y similares, así como

promotores inducibles, tales como pL de bacteriófago gamma, plac, ptrp, ptac. Cuando se clona en sistemas de células de mamíferos, se pueden usar promotores constitutivos, como SV40, RSV y similares, o promotores inducibles derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, la repetición terminal prolongada del virus del tumor mamario del ratón, el promotor tardío del adenovirus). También se pueden usar promotores producidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico de la invención.

Pueden diseñarse sistemas de expresión de mamíferos que utilizan virus elementos virales recombinantes para dirigir la expresión. Por ejemplo, cuando se usan vectores de expresión de adenovirus, la secuencia de ácido nucleico puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Alternativamente, se puede usar el promotor 7.5K del virus Vaccinia (véase Mackett 1982; Mackett 1984; Panicali 1982).

Para la expresión de levadura, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles (véase Ausubel 1988; Grant 1987; Glover 1986; Bitter 1987; y Strathem 1982). Los polinucleótidos pueden insertarse en un vector de expresión para la expresión *in vitro* (por ejemplo, utilizando kits de transcripción/traducción *in vitro*, que están disponibles comercialmente), o pueden insertarse en un vector de expresión que contiene una secuencia promotora que facilita la expresión en procariotas o eucariotas mediante la transferencia de un ácido nucleico apropiado a una célula, órgano, tejido u organismo adecuado *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, un “transgén” es cualquier pieza de un polinucleótido insertada por artificio en una célula huésped, y se convierte en parte del organismo que se desarrolla a partir de esa célula. Un transgén puede incluir uno o más promotores y cualquier otro ADN, como los intrones, necesarios para la expresión del ADN seleccionado, todos ellos operativamente unidos al ADN seleccionado, y puede incluir una secuencia potenciadora. Un transgén puede incluir un polinucleótido que es parcial o totalmente heterólogo (es decir, extraño) al organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo de un gen endógeno del organismo. Los transgenes pueden integrarse en el genoma de la célula huésped o mantenerse como un plásmido autorreplicante.

Tal como se usa en el presente documento, una “célula huésped” es una célula en la que se introduce un polinucleótido que puede propagarse, transcribirse o codificarse como polipéptido expresado. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped del sujeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental, ya que puede haber mutaciones que ocurren durante la replicación. Las células huésped incluyen, pero no se limitan a, células de bacterias, levaduras, insectos y mamíferos. Por ejemplo, bacterias transformadas con polinucleótidos de bacteriófagos recombinantes, ácido nucleico plasmídico o vectores de expresión de ácido nucleico cósmido; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV), o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmidos Ti), sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus), o sistemas celulares animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus vaccinia) o sistemas celulares de animales transformados diseñados para una expresión estable.

Tal como se usa en el presente documento, el término “transformación” significa un cambio genético en una célula después de la incorporación de un polinucleótido (por ejemplo, un transgén) exógeno a la célula. Por lo tanto, una “célula transformada” es una célula en la cual, o una progenie de la cual, un polinucleótido se ha introducido mediante técnicas recombinantes. La transformación de una célula huésped se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Cuando la célula huésped es un eucariota, los procedimientos de transformación del ADN incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, microinyección, electroporación, liposomas y vectores virales. Las células eucariotas también pueden cotransformarse con las secuencias de polinucleótidos de la invención o fragmentos de las mismas, y una segunda molécula de ADN que codifica un marcador seleccionable, como se describe en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica. Otro procedimiento consiste en usar un vector viral eucariótico, como el virus de simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente las células eucariotas y expresar la proteína (véase Gluzman 1982). Cuando el huésped es procariótico (por ejemplo, *E. coli*), las células competentes que son capaces de absorber ADN pueden prepararse a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y, posteriormente, tratarse mediante el método de CaCl2 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. La transformación de procariotas también se puede realizar por fusión de protoplastos de la célula huésped.

Los polipéptidos quiméricos, polinucleótidos y vectores de expresión que contienen los mismos de la presente invención pueden encapsularse dentro de liposomas usando técnicas estándar e introducirse en células u organismos completos. Los liposomas catiónicos son preferidos para la administración de polinucleótidos. El uso de liposomas para introducir diversas composiciones *in vitro* o *in vivo*, incluyendo proteínas y polinucleótidos, es conocido por los expertos en la materia.

Los liposomas pueden dirigirse a un tipo celular o tejido de interés mediante la adición a la preparación de liposomas de un ligando, tal como un polipéptido, para el cual se ha identificado un receptor celular correspondiente. Los

anticuerpos monoclonales también pueden usarse para la selección; muchos de estos anticuerpos específicos para una amplia variedad de proteínas de la superficie celular son conocidos por los expertos en la materia y están disponibles. El ligando seleccionado se conjuga covalentemente con un anclaje lipídico en liposomas preformados o se incorpora durante la preparación de liposomas (véase Lee 1994 y Lee 1995).

Como los polipéptidos o polinucleótidos quiméricos de la presente invención se administrarán a seres humanos, el presente documento también proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos o polinucleótidos quiméricos descritos. Las composiciones administradas a un sujeto, por lo tanto, estarán en una formulación “farmacéuticamente aceptable” o “fisiológicamente aceptable”.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “farmacéuticamente aceptable” y “fisiológicamente aceptable” se refieren a portadores, diluyentes, excipientes y similares que pueden administrarse a un sujeto, preferiblemente sin efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo, náuseas, dolores de cabeza, etc.). Tales preparaciones para la administración incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y tampones. Los vehículos incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen rellenos de líquidos y nutrientes, rellenos de electrolitos (como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Varias formulaciones farmacéuticas apropiadas para la administración a un sujeto y conocidas en la técnica se pueden aplicar en los procedimientos de la presente divulgación (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) y The Merck Index, 12ª ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ (1996)).

El control de la duración de la acción o el suministro controlado de una composición administrada se puede lograr incorporando la composición en partículas o en una sustancia polimérica, como poliésteres, ácidos de poliamina, hidrogel, polivinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de lactida/glicólido, copolímeros de polilactida/glicólido, o copolímeros de etilenvinilacetato. La velocidad de liberación de la composición puede controlarse alterando la concentración o composición de tales macromoléculas. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.

Las composiciones administradas mediante un procedimiento del presente documento pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección, mediante perfusión gradual a lo largo del tiempo, mediante administración de bolos o mediante un dispositivo implantable microfabricado. La composición se puede administrar por inhalación, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria (por ejemplo, vaginal o anal), por vía transdérmica, tópica o intravascular. Las composiciones pueden administrarse en dosis múltiples. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente una cantidad eficaz.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones. La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la(s) invención(es) descrita(s) en las reivindicaciones.

Ejemplos

1. Constructos de proteínas de fusión anti-EGFR1-PD1 para dianas de cáncer

El anti-EGFR (Cetuximab) ha sido aprobado para el cáncer escamoso de cabeza y cuello (local o regionalmente avanzado en combinación con radioterapia y metástasis después de la terapia basada en platino) y EGFR que expresa cáncer colorrectal metastásico (monoterapia en pacientes después del fracaso de oxaliplatino y quimioterapia basada en irinotecán o en pacientes intolerantes a la quimioterapia basada en irinotecán). No aplicable para pacientes con cáncer colorrectal (CCR) que tienen mutaciones K-RAS.

En varios estudios, alrededor del 55-60 % de los pacientes con mCRC responden al cetuximab en la configuración de primera línea, sin embargo, esta respuesta también es transitoria (ventaja de supervivencia libre de progresión (SLP) de 1.5-2 meses) (EPAR). Un número significativo de pacientes no responde al cetuximab o se vuelven resistentes al tratamiento. En el cáncer metastásico recurrente de cabeza y cuello, solo el 35 % de los pacientes responden al cetuximab con quimioterapia con una ventaja de supervivencia global (SG) y (PFS) de solo 2-3 meses.

Claramente, existe una importante necesidad no satisfecha de mejorar la eficacia de la terapia con cetuximab en estas dos indicaciones. Además, el EGFR también se expresa en el cáncer gástrico, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y los cánceres de páncreas. Sin embargo, el cetuximab no ha demostrado ningún beneficio significativo en estas indicaciones sobre el estándar de atención. Por lo tanto, la presente invención proporciona mejoras al combinar cetuximab con una terapia inmunomoduladora.

La muerte programada-1 (PD-1) es un receptor inhibitorio expresado en células T después de la activación. Se ha demostrado que regula a la baja la actividad de las células T al unir su ligando PD-L1 a las APC. Muchos tumores expresan constitutivamente PD-L1 y su sobreexpresión se ha asociado con inmunidad tumoral deteriorada, enfermedad más agresiva y disminución de la supervivencia (véase Thompson 2004). Hasta la fecha, se ha demostrado que la expresión de PD-L1 se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con carcinoma de células renales (CCR), cáncer de ovario y melanoma. El análisis inmunohistoquímico de muestras de tumores recién aisladas de pacientes con cáncer de ovario, pulmón y mama, carcinoma de células renales, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de esófago, glioblastoma, timoma, carcinoma de colon, páncreas y melanoma reveló que la gran mayoría expresa B7-H1 (véase Flies 2011; Nomi 2007). Varios estudios preclínicos han demostrado un mayor rechazo del tumor al bloquear la interacción PD1-PDL1. Recientemente, las terapias basadas en anti-PD1 y PD-L1 han demostrado una actividad considerable en el melanoma y en algunos otros tumores sólidos que confirman su aplicación como una de las terapias contra el cáncer más prometedoras.

La terapia basada en cetuximab puede mejorarse combinándola con inmunomodulación para eliminar el entorno inmunosupresor o retrasar el desarrollo de resistencia. Además, los pacientes que desarrollan resistencia al cetuximab debido a mutaciones en las vías posteriores pueden seguir beneficiándose de Anti-EGFR1-PD-1 ya que la proteína de fusión de la presente invención se une al receptor EGFR y niega la PD-L1 expresada por los tumores, permitiendo a las células T montar una respuesta antitumoral. Por consiguiente, las proteínas de fusión de la presente invención pueden unirse a EGFR y PD-L1 en la superficie de las células tumorales.

Los constructos de proteínas de fusión anti-EGFR1-PD1 de la presente invención se pueden usar en cáncer colorrectal, cáncer escamoso de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico y cáncer de páncreas.

Diseño y selección de las moléculas:

Las moléculas de fusión de anticuerpos de la presente invención tienen propiedades terapéuticas duales. Por un lado, la molécula retiene toda la actividad del Anti-EGFR1 (Cetuximab) y, en paralelo, tiene la actividad de unión al receptor PD-L1 en el entorno del tumor. Las nuevas moléculas de las proteínas de fusión Anti-EGFR1-PD1 que se desarrollaron para las terapias contra el cáncer en el presente documento carecen del aminoácido lisina 'K' del extremo C de la cadena pesada por las razones descritas anteriormente. El objetivo principal del diseño de la proteína de fusión es mantener la molécula anti-EGFR1 intacta junto con su función no afectada y permite la fusión de la molécula PD1 con la ubicación diferente en el anticuerpo anti-EGFR1. Es decir, la fusión con el extremo C de HC, el extremo C de LC, el extremo N de HC y/o el extremo N de LC y las fusiones dobles en ambas cadenas como se muestra en la Figura 6.

Se diseñaron los siguientes constructos.

Tabla 1

n. º constructos	Nombre de mAb de fusión
FMab5 Figura 6	Anti-EGFR1 HC-PD1 + Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 7, SEQ ID NO: 15 y 9)
FMab6 Figura 6	Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -PD1 (secuencias AA en la Figura 8, SEQ ID NO: 8 y 16)
FMab7 Figura 6	PD1-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 9, SEQ ID NO: 17 y 9)
FMab8 Figura 6	Anti-EGFR1 HC + PD1-Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 10, SEQ ID NO: 8 y 18)

Expresión de los constructos de fusión anteriores en células CHO:

Las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones de los dominios individuales Anti-EGFR1-PD1 se optimizaron para la expresión en células CHO. Tales secuencias optimizadas (SEQ ID NO: 1, 2, 7 y 4) se ensamblaron en un vector de expresión de mamífero con ayuda de los cebadores descritos en la Tabla 2:

Tabla 2

FMAB7FP1 AGA TAT CGC CAC CAT GAT GTC CTT CGT G SEQ ID NO: 19

FMAB7FP2 GGC GGC GGA GGC TCT CAG GTG CAG CTG AAG CAG TC SEQ ID NO: 20

FMAB7RP1 AGT ATA CTC AGC CGG GGG ACA GAG A SEQ ID NO: 21

FMAB7RP2	TTC AGC TGC ACC TGA GAG CCT CCG CCG CCA CTT C SEQ ID NO: 22
FMAB7LCRP	ATT AAT TAA TCA ACA CTC GCC CCG GTT GAA GGA CT SEQ ID NO: 23
FMAB6FP2	CTC TGT CCC CCG GCG GCG GCG GAG GAT CTG GCG GA SEQ ID NO: 24
FMAB6RP2	GAT CCT CCG CCG CCG CCG GGG GAC AGA GAC AGG GA SEQ ID NO: 25
FMAB6RP1	AGT ATA CTC ACA CCA GGG TCT GGAAC SEQ ID NO: 26

Usando el conjunto de cebadores de ADNc que se muestra arriba, los constructos se ensamblaron como se muestra en la Figura 11

2. Proteínas de fusión anti-EGFR1-TGFβRII para el tratamiento contra el cáncer

Los niveles altos de TGFβ son producidos por muchos tipos de tumores, incluidos los melanomas y los cánceres de mama, colon, esófago, estómago, hígado, pulmón, páncreas y próstata, así como tumores malignos hematológicos (véase Teicher 2001; Dong 2006). Se sabe que el TGFβ es inmunosupresor de células T y células NK mediante el bloqueo de la IL-2 y otros mecanismos, incluida la generación de T-regs. Varias líneas de evidencia sugieren que negar la actividad del TGFβ puede aumentar los efectos antitumorales de las células T (Wrzesinski 2007). Además, el TGFβ puede fomentar el crecimiento tumoral a través de la transición epitelial a mesenquimal y promover la angiogénesis. La expresión de TGFβ también se asocia con un mal pronóstico en los pacientes y una recurrencia más temprana. Sin embargo, considerando los efectos pleotrópicos de TGFβ en el control de la respuesta inmune, se ha demostrado que el bloqueo generalizado de la actividad de TGFβ puede dar como resultado una actividad autoinflamatoria generalizada. Por lo tanto, el agotamiento localizado de TGFβ en la vecindad del tumor puede ser una forma alternativa de modular el entorno inmunosupresor. La proteína de fusión anti-EGFR1-TGFβRII de la presente invención se une a EGFR en las células tumorales y une el TGFβ alrededor del tumor para mejorar la respuesta inmune contra las células tumorales.

Diseño y selección de las moléculas:

El objetivo es diseñar las moléculas de fusión de anticuerpos que tienen propiedades terapéuticas duales. Por un lado, la molécula debe conservar la actividad completa del Anti-EGFR1 (cetuximab) y en paralelo debe tener la actividad de unión a TGFβ en el ambiente del tumor. La secuencia de aminoácidos de la molécula de IgG anti-EGFR1 se mantuvo, excepto que la lisina no se expresó en el extremo C de la cadena pesada. Tanto la fusión simple como la doble y los niveles de expresión se muestran en la Tabla 3, en la que TGFβRII se fusionó con Anti-EGFR1.

Tabla 3

n. º constructos	Nombre de Mab de fusión
FMab1 Figura 12	Anti-EGFR1 HC-TGFpRII + Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 13, SEQ ID NO: 27 y 9)
FMab2 Figura 12	Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFpRII (secuencias AA en la Figura 14, SEQ ID NO: 8 y 28)
FMab3 Figura 12	TGFpRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 15, SEQ ID NO: 29 y 9)
FMab4 Figura 12	Anti-EGFR1 HC + TGFpRII-Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 16, SEQ ID NO: 8 y 30)
FMab9 Figura 12	Anti-EGFR1 HC-TGFpRII + Anti-EGFR1 LC -TGFpRII) (secuencias AA en la Figura 17, SEQ ID NO: 31 y 28)
FMab10 Figura 12	Anti-EGFR1 HC-TGFpRII + TGFpRII-Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 18, SEQ ID NO: 3 1 y 30)
FMab11 Figura 12	TGFpRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFpRII (secuencias AA en la Figura 19, SEQ ID NO: 29 y 28)
FMab12 Figure 12	TGFpRII-Anti-EGFR1 HC + TGFpRII-Anti-EGFR1 LC (secuencias AA en la Figura 20, SEQ ID NO: 29 y 30)

Expresión de los constructos de fusión anteriores en células CHO:

Las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones de los dominios individuales Anti-EGFR1-TGFβRII se optimizaron para la expresión en células CHO. Dichas secuencias (SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 3) se ensamblaron en un vector de expresión de mamífero. Los constructos de expresión se exponen en la Figura 21.

Transfección de la combinación de vectores anterior para obtener la línea celular deseada:

Los constructos de expresión desarrolladas anteriormente se transfectaron con la siguiente combinación, como se expone en la Tabla 4, en células CHO para producir las siguientes proteínas de fusión usando los constructos definidas en la Figura 21.

Tabla 4

n.º S1.	Nombre de la proteína de fusión	Combinación de constructos de expresión transfecatadas	Línea celular utilizada	Título g/L
FMab1	Anti-EGFR1 HC-TGFpRII + Anti-EGFR1 LC (extremo HC-C)	Constructos de expresión n.º 2 C y 3 C	CHO	0,11
FMab2	Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFpRII	Constructos de expresión n.º 1 C y 4 C	CHO	0,10
FMab3	TGFpRII -Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC	Constructos de expresión n.º 2 C y 5 C	CHO	0,09
FMab4	Anti-EGFR1 HC + TGFpRII -Anti-EGFR1 LC	Constructos de expresión n.º 1 C y 6 C	CHO	0,08
FMab9	Anti-EGFR1 HC-TGFpRII + Anti-EGFR1 LC -TGFpRII	Constructos de expresión n.º 3 C y 4 C	CHO	ND/VL
FMab10	Anti-EGFR1 HC-TGFpRII + TGFpRII-Anti-EGFR1 LC	Constructos de expresión n.º 3 C y 6 C	CHO	0,06
FMab1 1	TGFpRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFpRII	Constructos de expresión n.º 4 C y 5 C	CHO	ND/V L
FMab12	TGFpRII-Anti-EGFR1 HC + TGFpRII-Anti-EGFR1 LC	Constructos de expresión n.º 5 C y 6 C	CHO	0,06

Purificación de los sobrenadantes de Mab de fusión utilizando la columna de proteína A:

Los anticuerpos monoclonales de fusión (Mab) que utilizan proteínas recombinantes producen el sobrenadante del cultivo de células CHO.

Procedimiento:

El procedimiento describe en detalle el procedimiento de purificación a pequeña escala de IgG utilizando una columna C10/10 o XK26 y utilizando una resina de afinidad Mab Select Xtra. Las muestras generadas por este protocolo se pueden utilizar para varios análisis.

Flujo del procedimiento:

El sobrenadante de cultivo secretado a partir de la línea celular recombinante que produce anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales de fusión en condiciones estériles se sometió a pruebas de detección de títulos y endotoxinas;

La cromatografía de afinidad que usa resina Mab Select Xtra Protein A se lavó y se equilibró con tampón de unión;

El pH del sobrenadante se ajustó utilizando fosfato 0,5 M al mismo pH que tiene la columna;

Se dejó que el sobrenadante se uniera a la columna/pasara a través de la columna a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto para lograr la máxima unión;

Todos los Mab de fusión se unen a través de la región Fc y el resto de las impurezas pasaron a través de ella como flujo;

La columna se lavó con tampón de equilibrado;

Los Mab de fusión unidos se eluyeron utilizando 0,1 M de glicina de pH 3,0;

Las proteínas eluidas se ajustaron de nuevo a pH neutro o al pH de la formulación estable;

Las proteínas purificadas se almacenaron a -20 °C o a 2-8 °C dependiendo de la estabilidad.

Análisis de Mab de Fusión purificados de Proteína A usando SDS PAGE:

Los sobrenadantes transfectados obtenidos se purificaron usando una columna de afinidad de proteinA. Posteriormente, se analizaron en SDS-PAGE reductor y no reductor para descubrir la integridad de la molécula, tal como se muestra en la Figura 22, donde en proteinA se analizaron muestras purificadas en SDS-PAGE reductor al 12 %. Como se esperaba, todos los socios de fusión dan el patrón esperado en SDS-PAGE. La fusión de LC y HC se lleva a cabo muy cerca, pero las bandas están separadas. Esta movilidad más alta puede deberse a los 8 sitios de N-glicosilación (TGBRII 3 * 2 = 6 + 2 en LC).

La figura 23 muestra los resultados de las muestras purificadas con ProteinA que se analizaron en un 6 % de SDS-PAGE no reductor y aunque la composición de aminoácidos es la misma, existe una diferencia en la movilidad. Puede deberse a los niveles variables del patrón de glicosilación basado en la posición TGFβRII y el acceso en la molécula.

3. Constructos de proteínas de fusión anti-CTLA4-PD1 para dianas de cáncer

El análisis inmunohistoquímico de muestras de tumores recién aisladas de pacientes con cáncer de ovario, pulmón y mama, carcinoma de células renales, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma esofágico, glioblastoma, timoma, carcinoma de colon, páncreas y melanoma encontró que la gran mayoría expresa B7-H1 (véase Flies 2011; Nomi 2007). Varios estudios preclínicos han demostrado un aumento del rechazo del tumor al bloquear la interacción PD1-PDL1. Recientemente, las terapias basadas en anti-PD1 y PD-L1 han demostrado una actividad considerable en el melanoma y en otros tumores sólidos que confirman su aplicación como una de las terapias contra el cáncer más prometedoras.

Aunque el anti-CTLA4 puede permitir la coestimulación de las células T, aún pueden ser inhibidas por la interacción PD-L1-PD-1. Esta puede ser una de las razones por las cuales solo una minoría de pacientes responde al anticuerpo anti-CTLA4. El anticuerpo de fusión tanto de anti-CTLA4 como de PD1 es más eficaz que cualquiera de los dos agentes por sí mismo, ya que el anti-CTLA4 permite la coestimulación de las células T, mientras que PD1 se une a la PD-L1 en las células tumorales para anular la inmunosupresión de las células T en el microentorno tumoral. Esto incluso puede ser más seguro que el anti-CTLA4 porque el uso solitario de anti-CTLA4 ha provocado eventos adversos de avance inmune.

Diseño y selección de las moléculas:

El objetivo es diseñar las moléculas de fusión de anticuerpos que tienen propiedades terapéuticas duales. Por un lado, la molécula debe conservar la actividad completa del anti-CTLA4 (Ipilimumab) y, en paralelo, debe tener la actividad de unión al receptor PD L1 en el entorno del tumor. Se utilizó la secuencia de aminoácidos completa de la molécula de IgG anti-CTLA4, excepto por la eliminación de la lisina en el extremo C de la cadena pesada. Se colocó un enlazador de 15 aminoácidos entre el PD1 y el Anti-CTLA4. Las siguientes combinaciones de constructos, como se establece en la Tabla 5, se diseñaron como se muestra en la Figura 24. Los detalles de los constructos de proteínas de fusión anteriores se dan a continuación.

Tabla 5

n. º constructos	Nombre de Mab de fusión
FMab13 Figura 21	Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC (secuencias AA en la Figura 25, SEQ ID NO: 32 y 14)
FMab14 Figura 21	Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1(secuencias AA en la Figura 26, SEQ ID NO: 13 y 33)
FMab15 Figura 21	PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC (secuencias AA en la Figura 27, SEQ ID NO: 34 y 14)
FMab16 Figura 21	Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC (secuencias AA en la Figura 28, SEQ ID NO: 13 y 35)
FMab17 Figura 21	Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC-PD1 (secuencias AA en la Figura 29, SEQ ID NO: 32 y 33)

n. º constructos	Nombre de Mab de fusión
FMab18 Figura 21	Anti-CTLA4 HC-PD1 + PD1-Anti-CTLA4 LC (secuencias AA en la Figura 30, SEQ ID NO: 32 y 35)
FMab19 Figura 21	PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1 (secuencias AA en la Figura 31, SEQ ID NO: 34 y 33)
FMab20 Figura 21	PD1-Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC (secuencias AA en la Figura 32, SEQ ID NO: 34 y35)

Expresión de los constructos de fusión anteriores en células CHO:

La secuencia de nucleótidos completa de los dominios individuales Anti-CTLA4-PD1 se optimizó mediante codones para la expresión en células CHO (SEQ ID NO: 7, 4, 5 y 6). Los ADNc fueron sintetizados. Los constructos se ensamblaron en vectores de expresión de mamíferos. La expresión de proteínas de fusión anti-CTLA4-PD1 usando los constructos que se exponen en la Figura 33.

Los constructos de expresión desarrolladas y mostradas en la Figura 33 se transfectaron en la siguiente combinación en células CHO (Tabla 6) para producir las siguientes proteínas de fusión. El título obtenido para cada constructo se menciona en la última columna.

Tabla 6

n.º S1.	Nombre de la proteína de fusión	Combinación de constructos de expresión transfecatadas	Línea celular utilizada	Título g/L
FMab 13	Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC	Constructos de expresión n.º 2 C y 3 C	CHO	0,175
FMab 14	Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1	Constructos de expresión n.º 1 C y 4 C	CHO	0,221
FMab 15	PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC	Constructos de expresión n.º 2 C y 5 C	CHO	0,029
FMab 16	Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC	Constructos de expresión n.º 1 C y 6 C	CHO	0,021
FMab 17	Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC-PD1	Constructos de expresión n.º 3 C y 4 C	CHO	0,137
FMab 18	Anti-CTLA4 HC-PD1 + PD1-Anti-CTLA4 LC	Constructos de expresión n.º 3 C y 6 C	CHO	0,012
FMab 19	PD1-Anti-CTLA4 HC + Anti-CTLA4 LC-PD1	Constructos de expresión n.º 4 C y 5 C	CHO	0,029
FMab 20	PD1-Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC	Constructos de expresión n.º 5 C y 6 C	CHO	0,014

Purificación y caracterización de proteínas de fusión:

El procedimiento describe el uso del procedimiento de purificación a pequeña escala de IgG utilizando la columna C10/10 o XK26 y utilizando la resina de afinidad Mab Select Xtra. Las muestras generadas por este protocolo se pueden utilizar para varios análisis.

Flujo del procedimiento:

El sobrenadante de cultivo secretado a partir de la línea celular recombinante que produce anticuerpos monoclonales o anticuerpos monoclonales de fusión en condiciones estériles se probó para determinar el título y las endotoxinas;
La cromatografía de afinidad utilizando resina Mab Select Xtra ProteinA se lavó y se equilibró con un tampón de unión;
El pH del sobrenadante se ajustó utilizando fosfato 0,5 M al mismo pH que tiene la columna;
Se dejó que el sobrenadante se uniera a la columna/pasara a través de la columna a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto para lograr la unión máxima;

Todos los Mab de fusión se unen a través de la región Fc y el resto de las impurezas pasaron a través del flujo;
La columna se lavó con tampón de equilibrado;
Los Mab de fusión unidos se eluyeron utilizando glicina 0,1 M, pH 3,0;
Las proteínas eluidas se ajustaron de nuevo a pH neutro o al pH de la formulación estable; y
Las proteínas purificadas se almacenan a -20 °C o a 2-8 °C dependiendo de la estabilidad.

4. Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC (Fmab 1)

Procedimiento-ELISA de unión:

El Mab de fusión se probó para determinar su capacidad para unirse a sus dianas en tres ELISA diferentes: 1) ELISA de unión a diana EGFR1, 2) ELISA de unión a diana TGFβ y 3) ELISA bifuncional.

Para los ELISA de unión a diana, las dianas (quimera rhEGFR-Fc o TGFβ) se recubrieron en placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La unión del Mab de fusión se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG $F(ab)_2$ biotinilado, seguido de una incubación de 1 hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Para el ELISA bifuncional, la quimera rhEGFR-Fc se recubrió sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TGFβ y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió anti-TGFβ-biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Resultados:

La unión del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC a ambas dianas EGFR1 (Figura 34) y TGFβ (Figura 35) fue comparable con anti-EGFR1-TGFβRII. El Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + LC anti-EGFR1 también se probó en un ELISA bifuncional para determinar si los dominios anti-EGFR1 y TGFβRII del Mab se pueden unir a sus respectivas dianas sin interferir entre sí. Como se ve en la Figura 36, el Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + LC anti-EGFR1 se une a sus dos dianas, lo que sugiere que no hay interferencia en la unión de ninguna de las dianas a la constructo del Mab de fusión.

Unión a células que expresan EGFR1:

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron y se recogieron. Las células se tiñeron con diferentes diluciones del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC o Ig control a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron y se incubaron con conjugado anti-IgG humana - FITC a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Después del lavado, las células se analizaron en un citómetro de flujo. Las células vivas se activaron en función de sus perfiles FSC frente a SSC. Se registró el total de IMF para la población cerrada.

Resultados:

La fusión de anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC se une a las células A-431 que expresan EGFR de una manera dependiente de la dosis (Figura 37). La unión de anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC es comparable a la unión de anti-EGFR1-TGFβRII.

Actividad de citotoxicidad dependiente de anticuerpos

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron, se recogieron y se colocaron en placas de 96 pocillos. Las células se marcaron con diferentes diluciones del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC o Ig control a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Las células marcadas se incubaron conjuntamente con PBMC humanas recién aisladas a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 24 horas. La citotoxicidad se midió utilizando los kits de ensayo de citotoxicidad Cyto-Tox-Glo.

Resultados:

La fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC media la ADCC de células A-431 que expresan EGFR por células efectoras de PBMC humanas. La ADCC es dependiente de la dosis (Figura 38). Estos resultados sugieren que la porción Fc del Mab de fusión está intacta y funcional.

Inhibición de la proliferación

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron, se recogieron y se colocaron en placas de 96 pocillos. Se añadieron a las células diferentes diluciones del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC o Ig control. Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante tres días. En el tercer día, la proliferación celular se midió mediante el método AlamarBlue.

Resultados:

Se sabe que los anticuerpos anti-EGFR tales como Cetuximab inhiben la proliferación de células que expresan EGFR1. Como se ve en la Figura 39, la porción anti-EGFR del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC está intacta y tiene actividad antiproliferativa.

5. Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII (Fmab2)

ELISA de unión: Procedimiento:

El Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII se probó para determinar su capacidad para unirse a sus dianas en tres ELISA diferentes: 1) ELISA de unión a diana EGFR1, 2) ELISA de unión a diana TGFβ y 3) ELISA bifuncional.

Para los ELISA de unión a diana, las dianas (quimera rhEGFR-Fc o TGFβ) se recubrieron en placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La unión del Mab de fusión se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG $F(ab)_2$ biotinilado, seguido de una incubación de 1 hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Para el ELISA bifuncional, la quimera rhEGFR-Fc se recubrió sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TGFβ y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió anti-TGFβ-biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Resultados:

La unión del Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII a ambas dianas EGFR1 (Figura 40) y TGFβ (Figura 41) fue comparable a anti-EGFR1-TGFβRII. El Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII también se probó en un ELISA bifuncional para determinar si los dominios anti-EGFR1 y TGFβRII del Mab pueden unirse a sus respectivas dianas sin interferir entre sí. Como se ve en la Figura 42, el Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII se une a sus dos dianas, lo que sugiere que no hay interferencia en la unión de ninguna de las dianas debido al constructo del Mab de fusión.

Inhibición de la proliferación

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron, se recogieron y se colocaron en placas de 96 pocillos. Se añadieron a las células diferentes diluciones del Mab de fusión anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII o Ig de control. Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante tres días. En el tercer día, la proliferación celular se midió mediante el método AlamarBlue.

Resultados:

Se sabe que los anticuerpos anti-EGFR tales como Cetuximab inhiben la proliferación de células que expresan EGFR1. Como se ve en la Figura 43, la porción anti-EGFR del anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC -TGFβRII Mab de fusión está intacta y tiene actividad antiproliferativa.

6. TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (Fmab 3)

ELISA de unión: Procedimiento:

El Mab de fusión se probó para determinar su capacidad para unirse a sus dianas en tres ELISA diferentes: 1) ELISA de unión a diana EGFR1, 2) ELISA de unión a diana TGFβ y 3) ELISA bifuncional.

Para los ELISA de unión a diana, las dianas (quimera rhEGFR-Fc o TGFβ) se recubrieron sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 ºC. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La unión del Mab de fusión se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG $F(ab)_2$ biotinilado, seguido de una incubación de 1 hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Para el ELISA bifuncional, la quimera rhEGFR-Fc se recubrió sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TGFβ y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió anti-TGFβ-biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector híbrido BioTek Synergy H4.

Resultados:

La unión del Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC a las dianas EGFR1 (Figura 44) y TGFβ (Figura 45) fue comparable a la anti-EGFR1-TGFβRII. El Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC también se probó en un ELISA bifuncional para determinar si los dominios anti-EGFR1 y TGFβRII del Mab se pueden unir a sus respectivas dianas sin interferir entre sí. Como se ve en la Figura 46, la unión del Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC se reduce en comparación con el anti-EGFR1-TGFβRII, lo que sugiere que existe cierta interferencia en la unión a cualquiera de las dianas debido al constructo del Mab de fusión.

Unión a células que expresan EGFR1:

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron y se recogieron. Las células se tiñeron con diferentes diluciones del Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC o Ig control a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron y se incubaron con conjugado anti-IgG humana - FITC a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Después del lavado, las células se analizaron en un citómetro de flujo. Las células vivas se activaron en función de sus perfiles FSC frente a SSC. Se registró el total de IMF para la población cerrada.

Resultados:

La fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC se une a las células A-431 que expresan EGFR de una manera dependiente de la dosis. La unión de TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC es comparable a la unión de anti-EGFR1-TGFβRII.

Inhibición de la proliferación

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron, se recogieron y se colocaron en placas de 96 pocillos. Se añadieron a las células diferentes diluciones de la fusión de TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC o Ig de control. Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante tres días. En el tercer día, la proliferación celular se midió mediante el método AlamarBlue.

Resultados:

Se sabe que los anticuerpos anti-EGFR tales como Cetuximab inhiben la proliferación de células que expresan EGFR1. Como se ve en la Figura 47, la porción anti-EGFR del Mab de fusión LC TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 está intacta y tiene actividad antiproliferativa.

7. Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (Fmab 4)

ELISA de unión: Procedimiento:

El Mab de fusión se probó para determinar su capacidad para unirse a sus dianas en tres ELISA diferentes: 1) ELISA de unión a diana EGFR1, 2) ELISA de unión a diana TGFβ y 3) ELISA bifuncional.

Para los ELISA de unión a diana, las dianas (quimera rhEGFR-Fc o TGFβ) se recubrieron en placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La unión del Mab de fusión se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG $F(ab)_2$ biotinilado, seguido de una incubación de 1 hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Para el ELISA bifuncional, la quimera rhEGFR-Fc se recubrió sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TGFβ y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió anti-TGFβ-biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector híbrido BioTek Synergy H4.

Resultados:

La unión del Mab de fusión Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC a ambas dianas EGFR1 (Figura 48) y TGFβ (Figura 49) fue comparable con anti-EGFRβ-TGFβRII. El Mab de fusión Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC también se probó en un ELISA bifuncional para determinar si los dominios anti-EGFR1 y TGFβRII del Mab pueden unirse a sus respectivas dianas sin interferir entre sí. Como se ve en la Figura 50, la unión del Mab de fusión Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se reduce en comparación con el anti-EGFR1-TGFβRII, lo que sugiere que existe cierta interferencia en la unión a cualquiera de las dianas debido al constructo del Mab de fusión.

Unión a células que expresan EGFR1:

Procedimiento:

Las células A-431 se cultivaron en matraces hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80 %. Las células se tripsinizaron y se recogieron. Las células se tiñeron con diferentes diluciones de anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC Mab de fusión o Ig control a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron y se incubaron con conjugado anti-IgG humana - FITC a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Después del lavado, las células se analizaron en un citómetro de flujo. Las células vivas se activaron en función de sus perfiles FSC frente a SSC. Se registró el total de IMF para la población cerrada.

Resultados:

La fusión anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se une a las células A-431 que expresan EGFR de una manera dependiente de la dosis (Figura 51). La unión de Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC se reduce en comparación con la unión de anti-EGFR1-TGFβRII.

8. Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (Fmab 10)

ELISA de unión: Procedimiento:

El Mab de fusión se probó para determinar su capacidad para unirse a sus dianas en tres ELISA diferentes: 1) ELISA de unión a diana EGFR1, 2) ELISA de unión a diana TGFβ y 3) ELISA bifuncional.

Para los ELISA de unión a diana, las dianas (quimera rhEGFR-Fc o TGFβ) se recubrieron sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 ºC. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo

a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La unión del Mab de fusión se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG $F(ab)_2$ biotinilado, seguido de una incubación de 1 hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Para el ELISA bifuncional, la quimera rhEGFR-Fc se recubrió sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TGFβ y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió anti-TGFβ-biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H2SO4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector híbrido BioTek Synergy H4.

Resultados:

La unión del Mab anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC a la diana EGFR1 se redujo ligeramente (Figura 52) pero fue mayor para TGFβ (Figura 53) en comparación con la unión de anti-EGFR1 -TGFβRII. El Mab de fusión Anti-EGFR1-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 también se probó en un ELISA bifuncional para determinar si los dominios anti-EGFR1 y TGFβRII del Mab se pueden unir a sus respectivas dianas sin interferir entre sí. Como se ve en la Figura 54, la unión del Mab de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 es comparable a la anti-EGFR1-TGFβRII, lo que sugiere que no hay interferencia en la unión a ninguno de las dianas debido al constructo del Mab de fusión.

9. TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (Fmab 12)

ELISA de unión: Procedimiento:

El Mab de fusión se probó para determinar su capacidad para unirse a sus dianas en tres ELISA diferentes: 1) ELISA de unión a diana EGFR1, 2) ELISA de unión a diana TGFβ y 3) ELISA bifuncional.

Para los ELISA de unión a diana, las dianas (quimera rhEGFR-Fc o TGFβ) se recubrieron con placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 ºC. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La unión del Mab de fusión se detectó mediante la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG $F(ab)_2$ biotinilado, seguido de una incubación de 1 hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector BioTek Synergy H4 Hybrid.

Para el ELISA bifuncional, la quimera rhEGFR-Fc se recubrió sobre placas NUNC maxisorb durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y luego se bloquearon con superbloque a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron diferentes diluciones del Mab de fusión o del anticuerpo de control negativo a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TGFβ y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió anti-TGFβ-biotina y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó y se añadió estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió solución de sustrato TMB y la reacción se detuvo con H_2SO_4 1N. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector híbrido BioTek Synergy H4.

Resultados:

La unión del Mab de TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 a la diana EGFR1 se redujo ligeramente (Figura 53) pero fue mayor para TGFβ (Figura 56) en comparación con la unión de anti-EGFR1-TGFβRII. El Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 también se probó en un ELISA bifuncional para determinar si los dominios anti-EGFR1 y TGFβRII del Mab se pueden unir a sus respectivas dianas sin interferir entre sí. Como se ve en la Figura 57, la unión del Mab de fusión TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 se reduce en comparación con el anti-EGFR1-TGFβRII, lo que sugiere que existe una interferencia en la unión a cualquier diana debido al constructo del Mab de fusión.

Referencias

Altschul, y col., 1990, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 15:403-10.

Ausubel, y col., (ed), 1998, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Bitter, y col., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast; Methods in Enzymology, 153:5 16-544.

Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Vol. 152, pp. 673-684.

Dong M., y col., 2006, Role of transforming growth factor-β in hematologic malignancies. Blood. 107:4589-4596.

Deutscher, M., y col., Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology, Vol. 182, Academic Press (1990).

Flies, y col., 2011, Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy, J Biol Med., 84(4): 409-421.

Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, Ch. 3, IRL Press, Wash., D.C.

Gluzman (ed.), 1982, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Grant, y col., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, Methods in Enzymology, Vol. 153, 516-544.

Lee, y col., 1994, Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. J Biol. Chem., 269:3 198.

Lee, y col., 1995, Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. Biochem. Biophys. Actu, 1233: 134-144.

Mackett, y col., 1982, Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7415-7419.

Mackett, y col., 1984, General method for production and selection of infectious vaccinia virus, J. Virol., 49:857-864.

Nomi, y col., 2007, Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res., 13:2151-7.

Okazaki, y col., 2007, PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical Application. International Immunology, Vol. 19, No. 7, pp. 813-824.

Panicali, y col.,1982, Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927-4931.

Pardoll, DM., 2012, The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer, 12(4): 252-64.

Strathem, y col., 1982, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II.

Thompson RH, y col., 2004, Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. Proc Natl Acad Sci U S A., 101(49):17174-9.

Teicher BA., 2001, Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor beta. Cancer Metastasis Rev; 20:133-143.

Wrzesinski, y col., 2007, Transforming Growth Factor-β and the Immune Response: Implications for Anticancer Therapy, Clin Cancer Res, 13; 5262.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biocon Limited

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN INMUNOMODULADORAS Y PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DE LAS MISMAS

<130> P12446EPPC

<150> 61/777.016
<151> 12-03-2013

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1344
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 1

caggtgcagc tgaagcagtc tggccctggc ctggtgcagc cctcccagtc cctgtccatc 60

acctgtaccg tgtccggctt ctccctgacc aactacggcg tgcactgggt gcgacagtcc 120

cccggcaagg gcctggaatg gctgggagtg atttggagcg gcggcaacac cgactacaac 180

acccccttca cctcccggct gtccatcaac aaggacaact ccaagtccca ggtgttcttc 240

aagatgaact ccctgcagtc caacgacacc gccatctact actgcgccag agccctgacc 300

tactatgact acgagttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgacagt gtccgccgct 360

tccaccaagg gcccctccgt gttccctctg gcccccctcca gcaagtccac ctctggcggc 420

accgctgccc tgggctgcct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aactctggcg ccctgacctc cggcgtgcac accttccctg ccgtgctgca gtcctccggc 540

ctgtactccc tgtcctccgt ggtgaccgtg ccctccagct ctctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaaggtgg acaagcgggt ggaacccaag 660

tcctgcgaca agacccacac ctgtcccccc tgccctgccc ctgaactgct gggcggacct 720

tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatctcccg gacccccgaa 780

gtgacctgcg tggtggtgga cgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac 840

gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccca gagaggaaca gtacaactcc 900

acctaccggg tggtgtctgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagag 960

tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg cctgccccca tcgaaaagac catctccaag 1020

gccaagggcc agccccgcga gccccaggtg tacaccctgc ccctagccg ggacgagctg 1080

accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaaaggct tctacccctc cgatatcgcc 1140

gtggaatggg agtccaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200

gactccgacg gctcattctt cctgtactcc aagctgaccg tggacaagtc ccggtggcag 1260

cagggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320

aagtccctgt ctctgtcccc cggc 1344

<210> 2
<211> 642
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 2

gacatcctgc tgacccagtc ccccgtgatc ctgtccgtgt ctcctggcga gcgggtgtcc 60

ttctcctgcc gggcctctca gtccatcggc accaacatcc actggtatca gcagcggacc 120

aacggctccc ctcggctgct gattaagtac gcctccgagt ccatctccgg catcccttcc 180

cggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctgt ccatcaactc cgtggaatcc 240

gaggacattg ccgactacta ctgccagcag aacaacaact ggcccaccac cttcggcgct 300

ggcaccaagc tggaactgaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccaccc 360

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag 480

gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc 540

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gt 642

<210> 3
<211> 411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 3
acaatccctc cacacgtgca gaaatccgtg aacaacgaca tgatcgtgac cgacaacaat 60

ggcgccgtga agttccccca gctgtgcaag ttctgcgacg tgcggttctc tacctgcgac 120

aaccagaaat cctgcatgtc caactgctcc atcacctcca tctgcgagaa gccccaggaa 180

gtgtgcgtgg ccgtgtggcg gaagaacgac gagaacatca ccctggaaac cgtgtgccac 240

gaccccaagc tgccctacca cgacttcatc ctggaagatg ccgcctcccc caagtgcatc 300

atgaaggaaa agaagaagcc cggcgagact ttcttcatgt gcagctgctc ctccgacgag 360

tgcaacgaca acatcatctt ctccgaagag tacaacacct ccaaccccga c 411

<210> 4
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 4

ggaggcggag gatctggcgg aggtggaagt ggcggcggag gctct 45

<210> 5
<211> 1341
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético
<400> 5

caggtgcagc tggtggaatc tggtggcgga gtggtgcagc ctggcagatc cctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt caccttctcc tcgtacacca tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtcaccttc atctcttacg acggcaacaa caagtactac 180

gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccatct actactgtgc tagaaccggc 300

tggctgggcc ccttcgatta ttggggccag ggcaccctcg tgaccgtctc gagcgctagc 360

acaaagggcc ctagtgtgtt tcctctggct ccctcttcca aatccacttc tggtggcact 420

gctgctctgg gatgcctggt gaaggattac tttcctgaac ctgtgactgt ctcatggaac 480

tctggtgctc tgacttctgg tgtccacact ttccctgctg tgctgcagtc tagtggactg 540

tactctctgt catctgtggt cactgtgccc tcttcatctc tgggaaccca gacctacatt 600

tgtaatgtga accacaaacc atccaacact aaagtggaca aacgggtgga acccaaatcc 660

tgtgacaaaa cccacacctg cccaccttgt cctgcccctg aactgctggg aggaccttct 720

gtgtttctgt tccccccccaa accaaaggat accctgatga tctctagaac ccctgaggtg 780

acatgtgtgg tggtggatgt gtctcatgag gaccctgagg tcaaattcaa ctggtacgtg 840

gatggagtgg aagtccacaa tgccaaaacc aagcctagag aggaacagta caattcaacc 900

tacagagtgg tcagtgtgct gactgtgctg catcaggatt ggctgaatgg caaggaatac 960

aagtgtaaag tctcaaacaa ggccctgcct gctccaattg agaaaacaat ctcaaaggcc 1020

aagggacagc ctagggaacc ccaggtctac accctgccac cttcaagaga tgaactgacc 1080

aaaaaccagg tgtccctgac atgcctggtc aaaggcttct acccttctga cattgctgtg 1140

gagtgggagt caaatggaca gcctgagaac aactacaaaa caaccccccc tgtgctggat 1200

tctgatggct ctttctttct gtactccaaa ctgactgtgg acaagtctag atggcagcag 1260

gggaatgtct tttcttgctc tgtcatgcat gaggctctgc ataaccacta cactcagaaa 1320

tccctgtctc tgtctcccgg g 1341

<210> 6
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 6

gagatcgtgc tgacccagtc tcctggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagctacc 60

ctgtcctgca gagcctctca gtccgtgggc tcctcttacc tggcctggta tcaacaaaaa 120

cccggccaag ctccccggct gctgatctac ggtgcctttt ctcgcgccac cggcatcccc 180

gaccggttct ccggatctgg ctctggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagtacggct cctcccctg gacctttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caaacgtacg gtcgcggcgc cttccgtgtt catcttccca 360

ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 420

taccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc 480

caggaatccg tgaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540

accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag 600

ggcctgtcca gccccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgt 645

<210> 7
<211> 450
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 7

cctggctggt ttctggactc ccctgaccgg ccctggaacc ccccaacctt ctctcctgcc 60

ctgctggtgg tgacagaggg cgacaacgcc accttcacct gttccttcag caacacctcc 120

gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccccagca accagaccga caagctggcc 180

gccttccccg aggacagatc ccagcctggc caggactgcc ggttcagagt gacccagctg 240

cccaacggcc gggacttcca catgtccgtg gtgcgagcca gacggaacga ctccggcacc 300

tacctgtgcg gcgccatctc tctggccccc aaggcccaga tcaaagagtc cctgcgggcc 360

gagctgagag tgaccgagag aagggccgag gtgcccaccg cccaccctag cccatctcca 420

agacctgccg gccagttcca gaccctggtg 450

<210> 8
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 8

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65                  70                  75                  80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
```

```
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
```

<210> 9
<211> 214

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 9

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

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

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 10

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

<210> 11
<211> 150
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 11

```
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1               5                   10                  15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
            20                  25                  30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
    50                  55                  60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65                  70                  75                  80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
                85                  90                  95

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

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
        115                 120                 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
    130                 135                 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
145                 150
```

<210> 12
<211> 137
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 12

```
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
1               5                  10                  15

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys
            20                  25                  30

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
        35                  40                  45

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
    50                  55                  60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
65                  70                  75                  80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
                85                  90                  95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
            100                 105                 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
        115                 120                 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
    130                 135
```

<210> 13
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 13

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

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

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

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
```

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 14
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 14

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15
<211> 613
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 15
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

```
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe
465                 470                 475                 480

Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr
                485                 490                 495

Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg
            500                 505                 510

Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp
        515                 520                 525

Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro
```

530 535 540

Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp
545 550 555 560

Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln
565 570 575

Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala
580 585 590

Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
595 600 605

Phe Gln Thr Leu Val
610

<210> 16
<211> 379
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 16
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

```
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro
225                 230                 235                 240

Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly
                245                 250                 255

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
            260                 265                 270

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu
        275                 280                 285

Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe
    290                 295                 300

Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val
305                 310                 315                 320

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

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
            340                 345                 350

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
        355                 360                 365

Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val
```

370 375

<210> 17
<211> 613
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 17

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

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

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

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

Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
180 185 190

Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys
195 200 205

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr
210 215 220

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

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala
245 250 255

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala
260 265 270

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
290 295 300

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
305 310 315 320

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
325 330 335

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
340 345 350

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
355 360 365

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
370 375 380

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
385 390 395 400

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
405 410 415

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
420 425 430

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
435 440 445

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

```
     450                 455                 460

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
465                 470                 475                 480

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                485                 490                 495

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        515                 520                 525

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    530                 535                 540

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
545                 550                 555                 560

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                565                 570                 575

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            580                 585                 590

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        595                 600                 605

Ser Leu Ser Pro Gly
    610
```

<210> 18
<211> 379
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 18

```
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1               5                   10                  15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
            20                  25                  30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
        35                  40                  45
```

```
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
    50                  55                  60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65                  70                  75                  80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
                85                  90                  95

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

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
        115                 120                 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
    130                 135                 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu
                165                 170                 175

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
            180                 185                 190

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser
        195                 200                 205

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
    210                 215                 220

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

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn
                245                 250                 255

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            260                 265                 270

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        275                 280                 285

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
```

290 295 300

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
305 310 315 320

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
325 330 335

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
340 345 350

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
355 360 365

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
370 375

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 19
agatatcgcc accatgatgt ccttcgtg 28

<210> 20
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 20
ggcggcggag gctctcaggt gcagctgaag cagtc 35

<210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 21
agtatactca gccgggggac agaga 25

<210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 22
ttcagctgca cctgagagcc tccgccgcca cttc 34

<210> 23
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 23
attaattaat caacactcgc cccggttgaa ggact 35

<210> 24
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 24
ctctgtcccc cggcggcggc ggaggatctg gcgga 35

<210> 25
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 25
gatcctccgc cgccgccggg ggacagagac aggga 35

<210> 26
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 26
agtatactca caccagggtc tggaac 26

<210> 27
<211> 600
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 27

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65                  70                  75                  80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr
    450                 455                 460

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
465                 470                 475                 480

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
                485                 490                 495
```

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
500 505 510

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

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
530 535 540

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
545 550 555 560

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
565 570 575

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
580 585 590

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
595 600

<210> 28
<211> 366
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 28
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

```
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln
                245                 250                 255

Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys
            260                 265                 270

Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln
        275                 280                 285

Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu
    290                 295                 300

Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu
305                 310                 315                 320

Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro
                325                 330                 335

Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp
            340                 345                 350
```

```
Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
        355                 360                 365
```

<210> 29
<211> 600
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 29

```
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
1               5                  10                  15

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys
            20                  25                  30

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
        35                  40                  45

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
    50                  55                  60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
65                  70                  75                  80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
                85                  90                  95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
            100                 105                 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
        115                 120                 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

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

Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
                165                 170                 175

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser
            180                 185                 190
```

```
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn
        195                 200                 205

Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr
                245                 250                 255

Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
        275                 280                 285

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
    290                 295                 300

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
305                 310                 315                 320

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
                325                 330                 335

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
            340                 345                 350

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
        355                 360                 365

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
    370                 375                 380

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
385                 390                 395                 400

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
                405                 410                 415

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
            420                 425                 430

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
        435                 440                 445
```

```
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
    450                 455                 460

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
465                 470                 475                 480

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
                485                 490                 495

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
        515                 520                 525

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
    530                 535                 540

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
545                 550                 555                 560

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
                565                 570                 575

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
            580                 585                 590

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        595                 600
```

<210> 30
<211> 366
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 30

```
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
1               5                   10                  15

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys
            20                  25                  30

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
        35                  40                  45
```

```
Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
    50                  55                  60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
65                  70                  75                  80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
                85                  90                  95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
            100                 105                 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
        115                 120                 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro
145                 150                 155                 160

Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg
                165                 170                 175

Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr
            180                 185                 190

Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
        195                 200                 205

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
    210                 215                 220

Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys
225                 230                 235                 240

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
                245                 250                 255

Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
            260                 265                 270

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
    290                 295                 300
```

```
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
305                 310                 315                 320

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
                325                 330                 335

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
            340                 345                 350

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        355                 360                 365
```

<210> 31
<211> 600
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 31

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65                  70                  75                  80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140
```

```
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
```

```
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr
    450                 455                 460

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
465                 470                 475                 480

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
                485                 490                 495

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
            500                 505                 510

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

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
    530                 535                 540

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
545                 550                 555                 560

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
                565                 570                 575

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
            580                 585                 590

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
        595                 600
```

<210> 32
<211> 612
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 32

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

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

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

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255
```

```
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                 410                 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            420                 425                 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly
    450                 455                 460

Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser
465                 470                 475                 480

Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys
                485                 490                 495

Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met
            500                 505                 510
```

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

Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn
530 535 540

Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser
545 550 555 560

Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile
565 570 575

Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu
580 585 590

Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe
595 600 605

Gln Thr Leu Val
610

<210> 33
<211> 380
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 33
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

```
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
            100                 105                 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
        115                 120                 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    130                 135                 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
            180                 185                 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
        195                 200                 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg
225                 230                 235                 240

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
                245                 250                 255

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
            260                 265                 270

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
        275                 280                 285

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

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
305                 310                 315                 320

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
                325                 330                 335

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
            340                 345                 350
```

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
355 360 365

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val
370 375 380

<210> 34
<211> 612
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 34
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

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

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

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

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

Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
195 200 205

Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr
210 215 220

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

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
260 265 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
275 280 285

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
290 295 300

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
305 310 315 320

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
325 330 335

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
340 345 350

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
355 360 365

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
370 375 380

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
385 390 395 400

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
405 410 415

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
420 425 430

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
435 440 445

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
450 455 460

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
465 470 475 480

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
485 490 495

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
515 520 525

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
530 535 540

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
545 550 555 560

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
565 570 575

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
580 585 590

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
595 600 605

Leu Ser Pro Gly
610

<210> 35
<211> 380
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 35

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

```
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
            20                  25                  30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
    50                  55                  60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65                  70                  75                  80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
                85                  90                  95

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

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
        115                 120                 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
    130                 135                 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145                 150                 155                 160

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
            180                 185                 190

Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile
    210                 215                 220

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
225                 230                 235                 240

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                245                 250                 255

Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
            260                 265                 270
```

```
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
        275                 280                 285

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

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
305                 310                 315                 320

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
                325                 330                 335

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
            340                 345                 350

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
        355                 360                 365

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    370                 375                 380
```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de una proteína de fusión terapéuticamente activa, en el que la proteína de fusión comprende un resto dirigido al tumor y al menos una molécula inmunomoduladora que contrarresta la tolerancia inmune de una célula cancerosa, en el que el resto dirigido al tumor es un anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA 4 y en el que la proteína de fusión se prepara mediante las siguientes etapas:

preparar una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión para la expresión en células CHO, siendo la secuencia de nucleótidos optimizada en codones modificada para aumentar las secuencias de CG, y en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones es SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo, SEQ ID NO: 2 o 6 para la cadena ligera del anticuerpo, SEQ ID NO: 3 o 7 para la molécula inmunomoduladora, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4, respectivamente, carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo;
clonar la secuencia optimizada de dicha proteína de fusión en las células CHO capaces de expresión transitoria o estable;
cultivar las células CHO en un medio en condiciones adecuadas para el cultivo y permitir que la célula huésped exprese la proteína de fusión; y
recoger proteínas de fusión secretadas y opcionalmente para purificación adicional.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula inmunomoduladora está unida al anticuerpo por una secuencia de aminoácidos expresada por SEQ ID NO: 4 de longitud suficiente para permitir la unión biespecífica de la proteína de fusión y está unida directamente o a través de un enlazador a la cadena pesada del anticuerpo, a la cadena ligera del anticuerpo o a ambas cadenas.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula inmunomoduladora está unida directamente o a través de un enlazador expresado por SEQ ID NO: 4 al extremo N o C de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo N o C de la cadena ligera del anticuerpo o ambos extremos N y C de ambas cadenas.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones comprenden SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 7.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones comprenden SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las secuencias de nucleótidos optimizadas en codones comprenden SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 4.

7. Una preparación que comprende proteínas de fusión terapéuticamente activas homogéneas, en la que las proteínas de fusión comprenden un resto dirigido al tumor y al menos una molécula inmunomoduladora, siendo el resto dirigido al tumor un anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4 y preparándose las proteínas de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión tiene una secuencia de nucleótidos optimizada en codones que codifica la proteína de fusión para la expresión en células CHO, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones se modifica para aumentar las secuencias CG, y en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones es SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo, SEQ ID NO: 2 o 6 para la cadena ligera del anticuerpo, SEQ ID NO: 3 o 7 para la molécula inmunomoduladora, en la que la secuencia de nucleótidos optimizada en codones SEQ ID NO: 1 o 5 para la cadena pesada del anticuerpo que se une a EGFR1 o CTLA-4, respectivamente, carece de nucleótidos para la expresión de una lisina en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo.

8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cadena pesada y la cadena ligera es SEQ ID NO: 1 y 2 o SEQ ID NO: 5 y 6, en la que el resto diana inmunomodulador es SEQ ID NO: 3 o 7.

9. Un vector que comprende las secuencias de ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una de SEQ ID NO: 15, 17, 27 o 29.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una de SEQ ID NO: 16, 18, 28 o 30.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una de SEQ ID NO: 28 o 30.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una de SEQ ID NO: 28 o 30.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una de SEQ ID NO: 14, 33 o 35.

15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una de SEQ ID NO: 33 o 35.

16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una de SEQ ID NO: 14, 33 o 35.

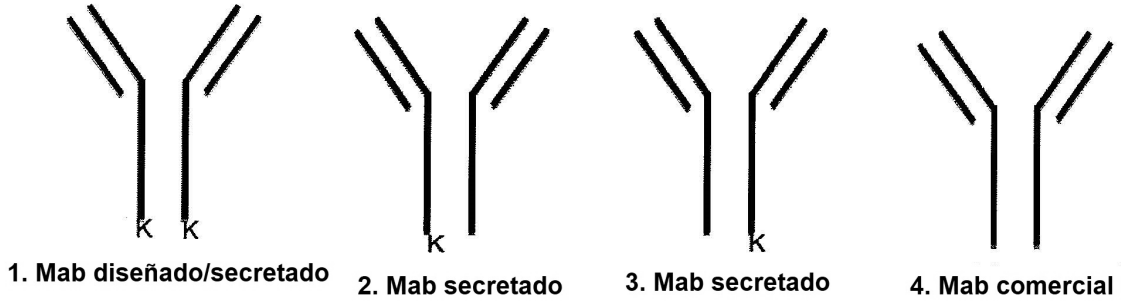

K K
1. Mab diseñado/secretado
K
2. Mab secretado
K
3. Mab secretado
4. Mab comercial

Figura 1

SEQ ID NO: 1

Secuencia de cadena pesada de Anti-EGFR1 optimizada en codones :

```
   1 CAGGTGCAGC TGAAGCAGTC TGGCCCTGGC CTGGTGCAGC CCTCCCAGTC CCTGTCCATC
  61 ACCTGTACCG TGTCCGGCTT CTCCCTGACC AACTACGGCG TGCACTGGGT GCGACAGTCC
 121 CCCGGCAAGG GCCTGGAATG GCTGGGAGTG ATTTGGAGCG GCGGCAACAC CGACTACAAC
 181 ACCCCCTTCA CCTCCCGGCT GTCCATCAAC AAGGACAACT CCAAGTCCCA GGTGTTCTTC
 241 AAGATGAACT CCCTGCAGTC CAACGACACC GCCATCTACT ACTGCGCCAG AGCCCTGACC
 301 TACTATGACT ACGAGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACAGT GTCCGCCGCT
 361 TCCACCAAGG GCCCCTCCGT GTTCCCTCTG GCCCCCTCCA GCAAGTCCAC CTCTGGCGGC
 421 ACCGCTGCCC TGGGCTGCCT GGTGAAAGAC TACTTCCCCG AGCCCGTGAC CGTGTCCTGG
 481 AACTCTGGCG CCCTGACCTC CGGCGTGCAC ACCTTCCCTG CCGTGCTGCA GTCCTCCGGC
 541 CTGTACTCCC TGTCCTCCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCT CTCTGGGCAC CCAGACCTAC
 601 ATCTGCAACG TGAACCACAA GCCCTCCAAC ACCAAGGTGG ACAAGCGGGT GGAACCCAAG
 661 TCCTGCGACA AGACCCACAC CTGTCCCCCC TGCCCTGCCC CTGAACTGCT GGGCGGACCT
 721 TCCGTGTTCC TGTTCCCCCC AAAGCCCAAG GACACCCTGA TGATCTCCCG GACCCCCGAA
 781 GTGACCTGCG TGGTGGTGGA CGTGTCCCAC GAGGACCCTG AAGTGAAGTT CAATTGGTAC
 841 GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCCA GAGAGGAACA GTACAACTCC
 901 ACCTACCGGG TGGTGTCTGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAAGAG
 961 TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGCCCTG CCTGCCCCCA TCGAAAAGAC CATCTCCAAG
1021 GCCAAGGGCC AGCCCCGCGA GCCCCAGGTG TACACCCTGC CCCCTAGCCG GGACGAGCTG
1081 ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGTCTG GTGAAAGGCT TCTACCCCTC CGATATCGCC
1141 GTGGAATGGG AGTCCAACGG CCAGCCCGAG AACAACTACA AGACCACCCC CCCTGTGCTG
1201 GACTCCGACG GCTCATTCTT CCTGTACTCC AAGCTGACCG TGGACAAGTC CCGGTGGCAG
1261 CAGGGCAACG TGTTCTCCTG CTCCGTGATG CACGAGGCCC TGCACAACCA CTACACCCAG
1321 AAGTCCCTGT CTCTGTCCCC CGGC
```

SEQ ID NO: 2

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de Anti-EGFR1 optimizada en codones:

```
   1 GACATCCTGC TGACCCAGTC CCCCGTGATC CTGTCCGTGT CTCCTGGCGA GCGGGTGTCC
  61 TTCTCCTGCC GGGCCTCTCA GTCCATCGGC ACCAACATCC ACTGGTATCA GCAGCGGACC
 121 AACGGCTCCC CTCGGCTGCT GATTAAGTAC GCCTCCGAGT CCATCTCCGG CATCCCTTCC
 181 CGGTTCTCCG GCTCCGGCTC TGGCACCGAC TTCACCCTGT CCATCAACTC CGTGGAATCC
 241 GAGGACATTG CCGACTACTA CTGCCAGCAG AACAACAACT GGCCCACCAC CTTCGGCGCT
 301 GGCACCAAGC TGGAACTGAA GCGGACCGTG GCCGCTCCCT CCGTGTTCAT CTTCCCACCC
 361 TCCGACGAGC AGCTGAAGTC CGGCACCGCC TCCGTGGTGT GCCTGCTGAA CAACTTCTAC
 421 CCCCGCGAGG CCAAGGTGCA GTGGAAGGTG GACAACGCCC TGCAGTCCGG CAACTCCCAG
 481 GAATCCGTGA CCGAGCAGGA CTCCAAGGAC AGCACCTACT CCCTGTCCTC CACCCTGACC
 541 CTGTCCAAGG CCGACTACGA GAAGCACAAG GTGTACGCCT GCGAAGTGAC CCACCAGGGC
 601 CTGTCCAGCC CCGTGACCAA GTCCTTCAAC CGGGGCGAGT GT
```

Figura 2

SEQ ID NO: 3

Secuencia de nucleótidos de TGF-βRII optimizada en codones:

```
  1 ACAATCCCTC CACACGTGCA GAAATCCGTG AACAACGACA TGATCGTGAC CGACAACAAT
 61 GGCGCCGTGA AGTTCCCCCA GCTGTGCAAG TTCTGCGACG TGCGGTTCTC TACCTGCGAC
121 AACCAGAAAT CCTGCATGTC CAACTGCTCC ATCACCTCCA TCTGCGAGAA GCCCCAGGAA
181 GTGTGCGTGG CCGTGTGGCG GAAGAACGAC GAGAACATCA CCCTGGAAAC CGTGTGCCAC
241 GACCCCAAGC TGCCCTACCA CGACTTCATC CTGGAAGATG CCGCCTCCCC CAAGTGCATC
301 ATGAAGGAAA AGAAGAAGCC CGGCGAGACT TTCTTCATGT GCAGCTGCTC CTCCGACGA G
361 TGCAACGACA ACATCATCTT CTCCGAAGAG TACAACACCT CCAACCCCGA C
```

SEQ ID NO: 4

Secuencia de nucleótidos de enlazador optimizada en codones:

```
  1 GGAGGCGGAG GATCTGGCGG AGGTGGAAGT GGCGGCGGAG GCTCT
```

SEQ ID NO: 5

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de AntiCTLA4 optimizada en codones:

```
   1 CAGGTGCAGC TGGTGGAATC TGGTGGCGGA GTGGTGCAGC CTGGCAGATC CCTGAGACTG
  61 TCTTGTGCCG CCTCCGGCTT CACCTTCTCC TCGTACACCA TGCACTGGGT GCGACAGGCC
 121 CCTGGCAAGG GACTGGAATG GGTCACCTTC ATCTCTTACG ACGGCAACAA CAAGTACTAC
 181 GCCGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGGGACA ACTCCAAGAA CACCCTGTAC
 241 CTGCAGATGA ACTCCCTGCG GGCCGAGGAC ACCGCCATCT ACTACTGTGC TAGAACCGGC
 301 TGGCTGGGCC CCTTCGATTA TTGGGGCCAG GGCACCCTCG TGACCGTCTC GAGCGCTAGC
 361 ACAAAGGGCC CTAGTGTGTT TCCTCTGGCT CCCTCTTCCA AATCCACTTC TGGTGGCACT
 421 GCTGCTCTGG GATGCCTGGT GAAGGATTAC TTTCCTGAAC CTGTGACTGT CTCATGGAAC
 481 TCTGGTGCTC TGACTTCTGG TGTCCACACT TTCCCTGCTG TGCTGCAGTC TAGTGGACTG
 541 TACTCTCTGT CATCTGTGGT CACTGTGCCC TCTTCATCTC TGGGAACCCA GACCTACATT
 601 TGTAATGTGA ACCACAAACC ATCCAACACT AAAGTGGACA AACGGGTGGA ACCCAAATCC
 661 TGTGACAAAA CCCACACCTG CCCACCTTGT CCTGCCCCTG AACTGCTGGG AGGACCTTCT
 721 GTGTTTCTGT TCCCCCCCAA ACCAAAGGAT ACCCTGATGA TCTCTAGAAC CCCTGAGGTG
 781 ACATGTGTGG TGGTGGATGT GTCTCATGAG GACCCTGAGG TCAAATTCAA CTGGTACGTG
 841 GATGGAGTGG AAGTCCACAA TGCCAAAACC AAGCCTAGAG AGGAACAGTA CAATTCAACC
 901 TACAGAGTGG TCAGTGTGCT GACTGTGCTG CATCAGGATT GGCTGAATGG CAAGGAATAC
 961 AAGTGTAAAG TCTCAAACAA GGCCCTGCCT GCTCCAATTG AGAAAACAAT CTCAAAGGCC
1021 AAGGGACAGC CTAGGGAACC CCAGGTCTAC ACCCTGCCAC CTTCAAGAGA TGAACTGACC
1081 AAAAACCAGG TGTCCCTGAC ATGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCTTCTGA CATTGCTGTG
1141 GAGTGGGAGT CAAATGGACA GCCTGAGAAC AACTACAAAA CAACCCCCCC TGTGCTGGAT
1201 TCTGATGGCT CTTTCTTTCT GTACTCCAAA CTGACTGTGG ACAAGTCTAG ATGGCAGCAG
1261 GGGAATGTCT TTTCTTGCTC TGTCATGCAT GAGGCTCTGC ATAACCACTA CACTCAGAAA
1321 TCCCTGTCTC TGTCTCCCGG G
```

Figura 2 Cont.

SEQ ID NO: 6

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de Anti-CTLA4 optimizada en codones:

```
   1 GAGATCGTGC TGACCCAGTC TCCTGGCACC CTGTCTCTGA GCCCTGGCGA GAGAGCTACC
  61 CTGTCCTGCA GAGCCTCTCA GTCCGTGGGC TCCTCTTACC TGGCCTGGTA TCAACAAAAA
 121 CCCGGCCAAG CTCCCCGGCT GCTGATCTAC GGTGCCTTTT CTCGCGCCAC CGGCATCCCC
 181 GACCGGTTCT CCGGATCTGG CTCTGGCACC GACTTCACCC TGACCATCTC CCGGCTGGAA
 241 CCCGAGGACT TCGCCGTGTA CTACTGCCAG CAGTACGGCT CCTCCCCCTG GACCTTTGGC
 301 CAGGGCACCA AGGTGGAAAT CAAACGTACG GTCGCGGCGC CTTCCGTGTT CATCTTCCCA
 361 CCCTCCGACG AGCAGCTGAA GTCCGGCACC GCCTCCGTGG TGTGCCTGCT GAACAACTTC
 421 TACCCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAAG GTGGACAACG CCCTGCAGTC CGGCAACTCC
 481 CAGGAATCCG TGACCGAGCA GGACTCCAAG GACAGCACCT ACTCCCTGTC CTCCACCCTG
 541 ACCCTGTCCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAGT GACCCACCAG
 601 GGCCTGTCCA GCCCCGTGAC CAAGTCCTTC AACCGGGGCG AGTGT
```

SEQ ID NO: 7

Secuencia de nucleótidos de PD1 optimizada en codones:

```
   1 CCTGGCTGGT TTCTGGACTC CCCTGACCGG CCCTGGAACC CCCCAACCTT CTCTCCTGCC
  61 CTGCTGGTGG TGACAGAGGG CGACAACGCC ACCTTCACCT GTTCCTTCAG CAACACCTCC
 121 GAGTCCTTCG TGCTGAACTG GTACAGAATG TCCCCCAGCA ACCAGACCGA CAAGCTGGCC
 181 GCCTTCCCCG AGGACAGATC CCAGCCTGGC CAGGACTGCC GGTTCAGAGT GACCCAGCTG
 241 CCCAACGGCC GGGACTTCCA CATGTCCGTG GTGCGAGCCA GACGGAACGA CTCCGGCACC
 301 TACCTGTGCG GCGCCATCTC TCTGGCCCCC AAGGCCCAGA TCAAAGAGTC CCTGCGGGCC
 361 GAGCTGAGAG TGACCGAGAG AAGGGCCGAG GTGCCCACCG CCCACCCTAG CCCATCTCCA
 421 AGACCTGCCG GCCAGTTCCA GACCCTGGTG
```

Figura 2 Cont.

SEQ ID NO: 8

Secuencia de aminoácidos de la constante de cadena pesada de Anti-EGFR1

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL
GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCAR
ALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 9

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-EGFR1

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYA
SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 10

Secuencia de aminoácidos del enlazador

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 11

Secuencia de aminoácidos de PD1

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR
MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND
SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ
TLV

Figura 3

SEQ ID NO: 8

Secuencia de aminoácidos de la constante de cadena pesada de Anti-EGFR1

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIY
YCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 9

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-EGFR1

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK
YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 10

Secuencia de aminoácidos del enlazador

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 12

Secuencia de aminoácidos de TGFRII

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITS
ICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKK
PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 4

SEQ ID NO: 13

Secuencia de aminoácidos de la constante de cadena pesada de Anti-CTLA-4

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISY
DGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 14

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-CTLA-4

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAF
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

SEQ ID NO: 10

Secuencia de aminoácidos del enlazador

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 11

Secuencia de aminoácidos de PD1

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW
YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV

Figura 5

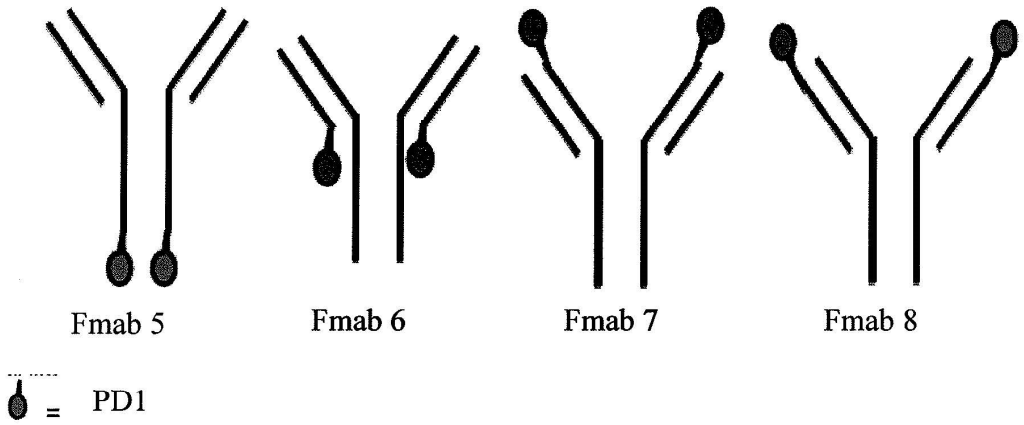


Figura 6

5. **Anti-EGFR1-PD1** (extremo HC-C):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PD1 de la constante HC de Anti-EGFR1:

SEQ ID NO: 15

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIY
YCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGSGGGGSGGGGS*
PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW
YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-EGFR1: **SEQ ID NO: 9**

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK
YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 7

6. Anti-EGFR1-PD1 (extremo LC-C):

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Anti-EGFR1: SEQ ID NO: 8

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL
GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCAR
ALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PD1 de la constante LC de Anti-EGFR1: SEQ ID NO: 16

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYA
SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC*GGGGSGGGGSGGGGS*PGWFLDSPDRPWNPPTFSP
ALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQ
PGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKES
LRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

Figura 8

7. Anti-EGFR1-PD1 (extremo HC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-EGFR1 HC:

SEQ ID NO: 17

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW
YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV*GGGGSGGGGSGGGGS*QVQLKQSGPGLVQPSQSLSIT
CTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSR
LSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQG
TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-EGFR1: SEQ ID NO: 9

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK
YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 9

8. **Anti-EGFR1-PD1** (extremo LC-N):

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Anti-EGFR1: **SEQ ID NO: 8**

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIY
YCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-EGFR1 LC: **SEQ ID NO: 18**

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW
YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV*GGGGSGGGGSGGGGS*DILLTQSPVILSVSPGERVSFS
CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF
TLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

Figura 10

Construcciones de expresión desarrolladas usando los ADNc:

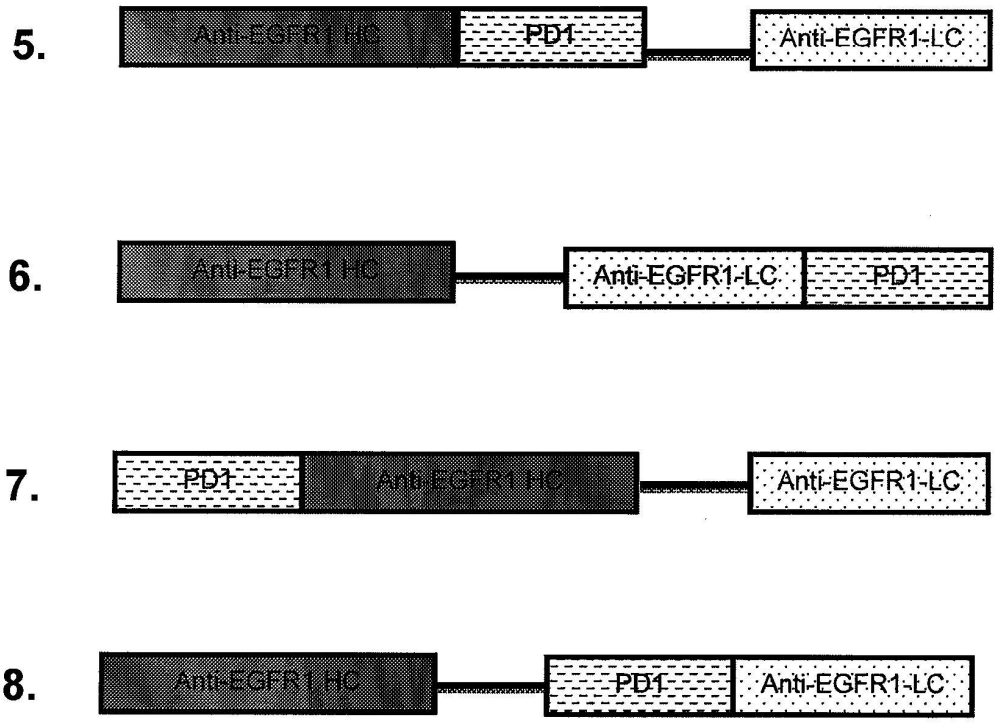


Figura 11

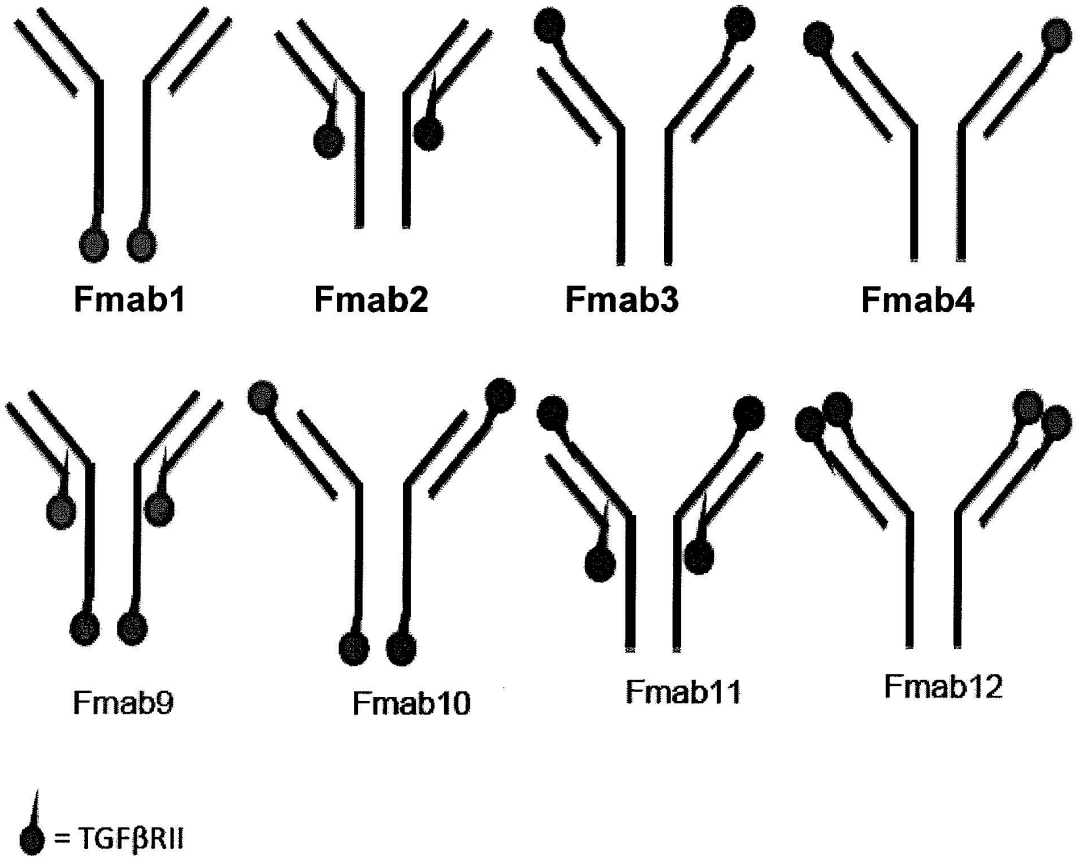

Fmab1
Fmab2
Fmab3
Fmab4
Fmab9
Fmab10
Fmab11
Fmab12
= TGFβRII

Figura 12

1. **Anti-EGFR1-TGFRII (extremo HC-C):**

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante Anti-EGFR1-TGFβRII HC: SEQ ID NO: 27

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCD
VRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-EGFR1: SEQ ID NO: 9

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF
SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 13

2. **Anti-EGFR1-TGFβRII (extremo LC-C):**

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Anti-EGRF1: SEQ ID NO: 8

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS
RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante Anti-EGFR1-TGFβRII LC:
SEQ ID NO: 28

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS
GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKF
CDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAS
PKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 14

3. Anti-EGFR1-TGFβRII (extremo HC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable Anti-EGFR1-TGFβRII HC: SEQ ID NO: 29

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV
HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCA
RALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-EGFR1: SEQ ID NO: 9

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF
SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 15

4. Anti-EGFR1-TGFβRII (extremo LC-N):

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Anti-EGFR1: SEQ ID NO: 8

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable Anti-EGFR1-TGFβRII LC: SEQ ID NO: 30

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH
WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPT
TFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 16

9. Anti-EGFR1-TGFβRII (extremo HC-C y extremo LC-C):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante Anti-EGFR1-TGFβRII HC: SEQ ID NO: 31

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCD
VRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante Anti-EGFR1-TGFβRII LC: SEQ ID NO: 28

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF
SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDN
NGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 17

10. Anti-EGFR1-TGFβRII (extremos HC-C y LC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante Anti-EGFR1-TGFβRII HC: SEQ ID NO: 31

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCD
VRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable Anti-EGFR1-TGFβRII LC: SEQ ID NO: 30

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH
WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPT
TFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 18

11. Anti-EGFR1-TGFβRII (extremo HC-N y extremo LC-C):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable Anti-EGFR1-TGFβRII HC: SEQ ID NO: 29

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV
HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCA
RALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante Anti-EGFR1-TGFβRII LC: SEQ ID NO: 28

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF
SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDN
NGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 19

12. Anti-EGFR1-TGFβRII (extremo HC-N y extremo LC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable Anti-EGFR1-TGFβRII HC: SEQ ID NO: 29

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV
HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCA
RALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable Anti-EGFR1-TGFβRII LC: SEQ ID NO: 30

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDN
IIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH
WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPT
TFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 20

Construcciones de expresión desarrolladas usando los ADNc:

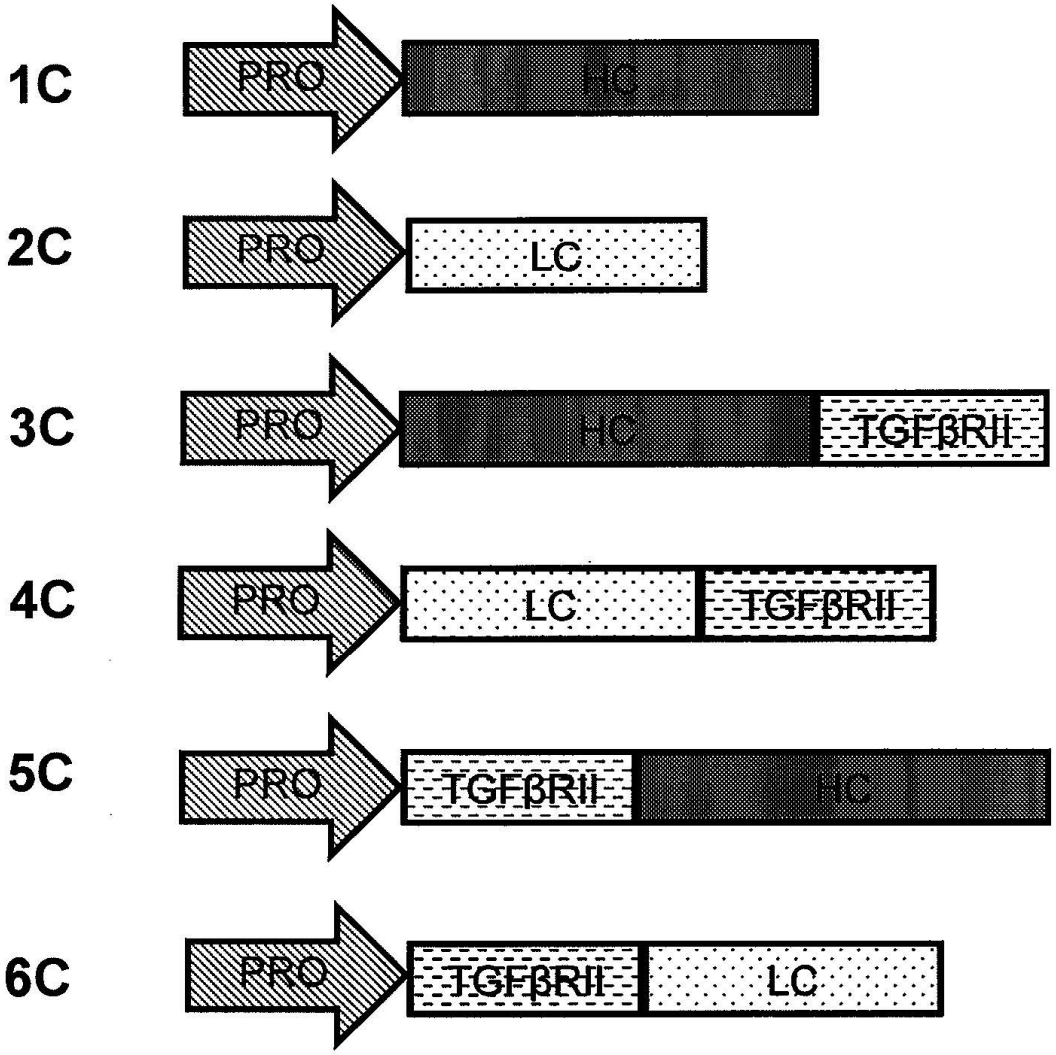


Figura 21

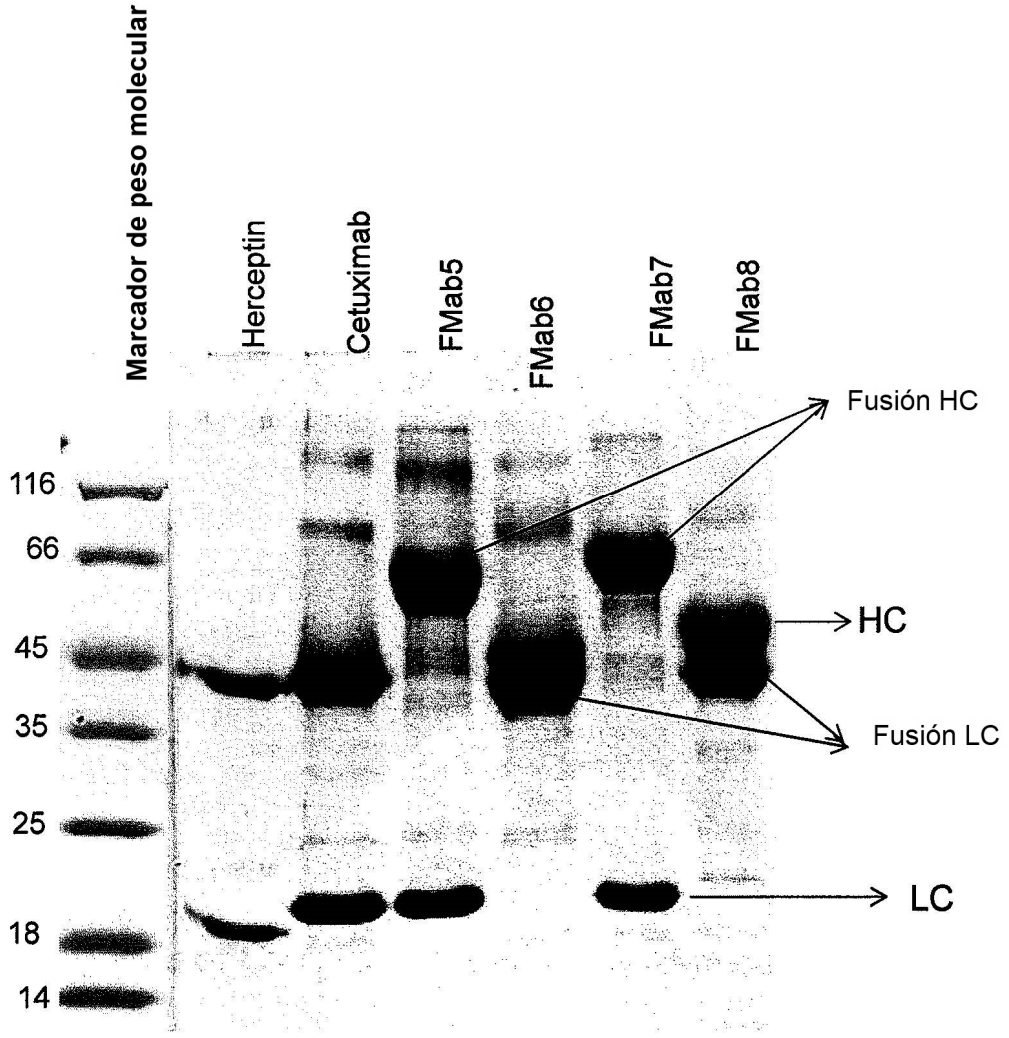

Marcador de peso molecular
Herceptin
Cetuximab
FMab5
FMab6
FMab7
FMab8
116
66
45
35
25
18
14
Fusión HC
HC
Fusión LC
LC

Figura 22

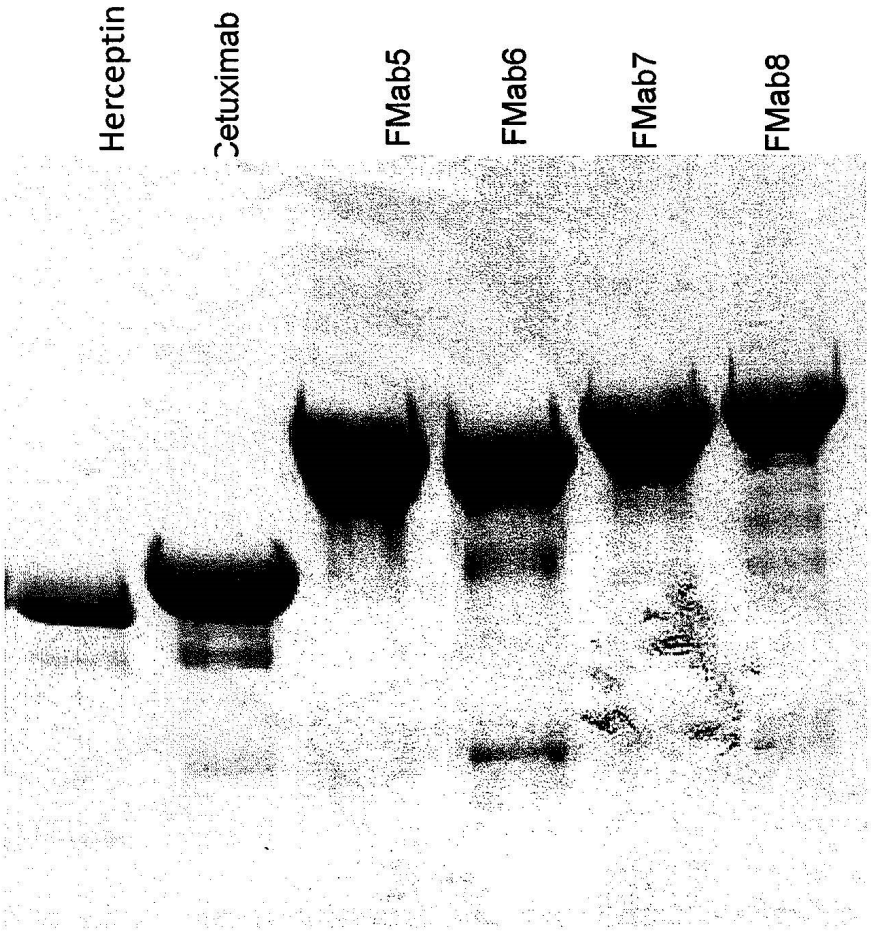


Figura 23

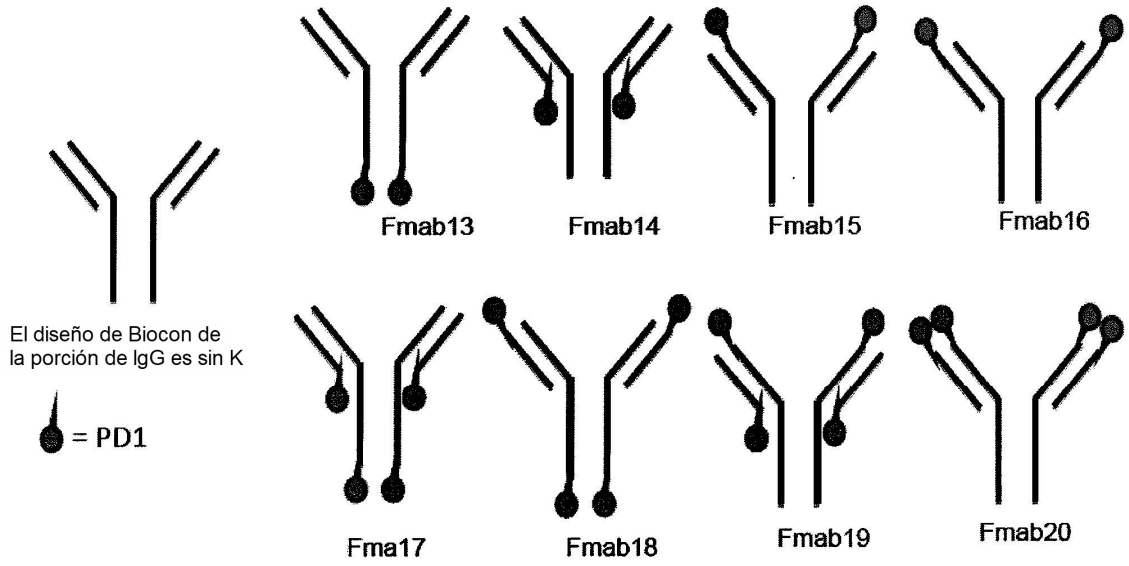

El diseño de Biocon de
la porción de IgG es sin K
= PD1
Fmab13
Fmab14
Fmab15
Fmab16
Fma17
Fmab18
Fmab19
Fmab20

Figura 24

13. Anti-CTLA4-PD1 (extremo HC-C):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PD1 de la constante HC de Anti-CTLA4: SEQ ID NO: 32

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTC
SFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-CTLA4: SEQ ID NO: 14

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 25

14. Anti-CTLA4-PD1 (extremo LC-C):

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Anti-CTLA4: SEQ ID NO: 13

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PD1 de la constante LC de Anti-CTLA4: SEQ ID NO: 33

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPTFS
PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLV

Figura 26

15. Anti-CTLA4-PD1 (extremo HC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-CTLA4 HC: SEQ ID NO: 34

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF
PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Anti-CTLA4: SEQ ID NO: 14

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 27

16. Anti-CTLA4-PD1 (extremo LC-N):

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Anti-CTLA4: SEQ ID NO: 13

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-CTLA4 LC: SEQ ID NO: 35

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF
PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATL
SCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
FAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Figura 28

17. Anti-CTLA4-PD1 (extremo HC-C y extremo LC-C):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante PD1-Anti-CTLA4 HC:
SEQ ID NO: 32

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTC
SFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante PD1-Anti-CTLA4 LC:
SEQ ID NO: 33

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPTFS
PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLV

Figura 29

18. Anti-CTLA4-PD1 (extremo HC-C y extremo LC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante PD1-Anti-CTLA4 HC: SEQ ID NO: 32

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTC
SFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante PD1-Anti-CTLA4 LC: SEQ ID NO: 33

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF
PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATL
SCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
FAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Figura 30

19. Anti-CTLA4-PD1 (extremo HC-N y extremo LC-C):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-CTLA4 HC: SEQ ID NO: 34

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF
PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión constante PD1-Anti-CTLA4 LC: SEQ ID NO: 33

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPTFS
PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLV

Figura 31

20. Anti-CTLA4-PD1 (extremo HC-N y extremo LC-N):

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-CTLA4 HC:
SEQ ID NO: 34

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF
PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión variable PD1-Anti-CTLA4 LC:
SEQ ID NO: 35

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF
PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATL
SCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
FAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Figura 32

Construcciones de expresión desarrolladas usando los ADNc:

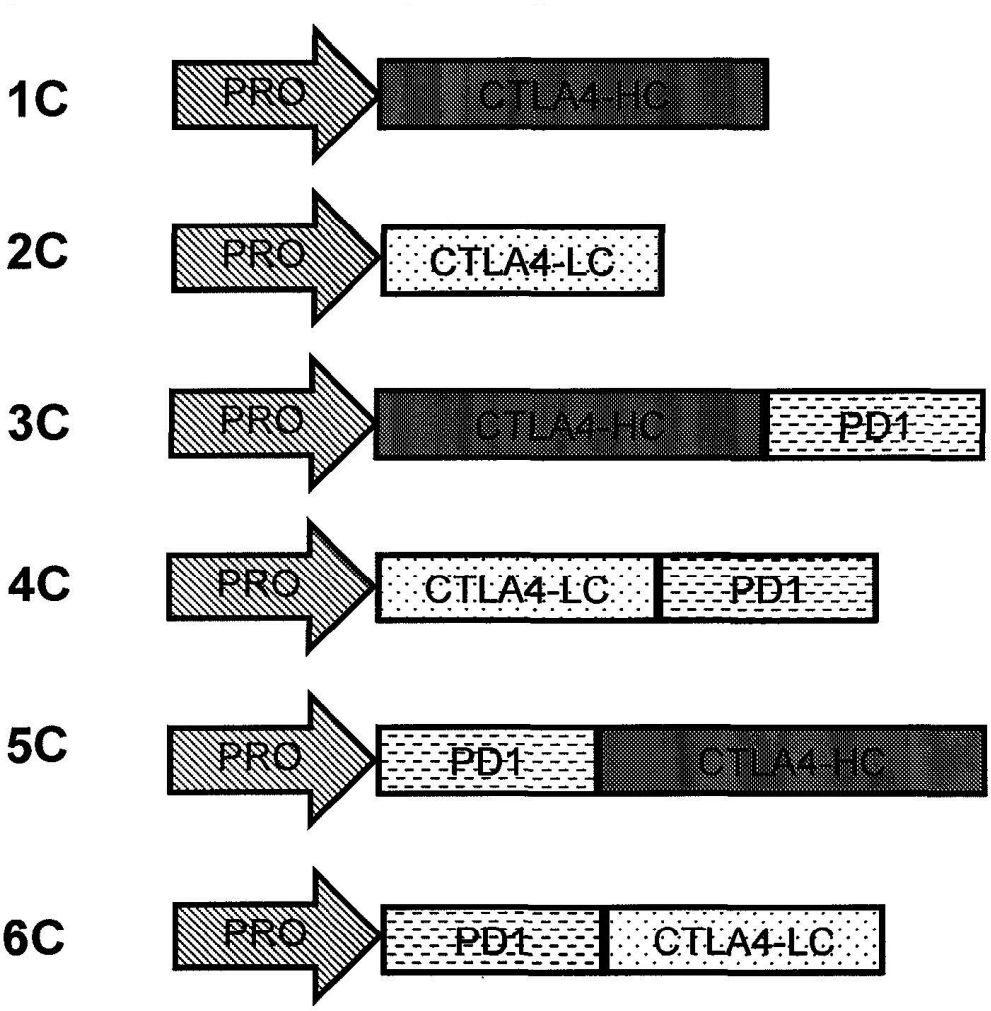


Figura 33

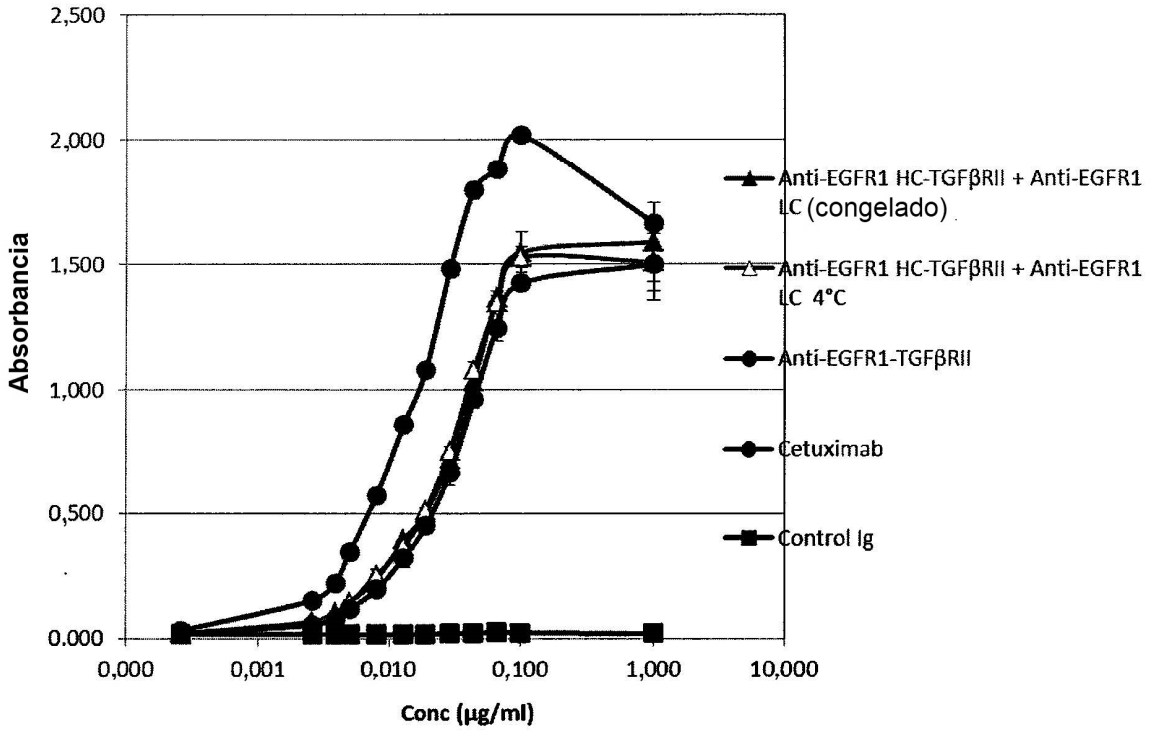

2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0.000
Absorbancia
0,000
0,001
0,010
0,100
1,000
10,000
Conc (µg/ml)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC 4°C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Cetuximab
Control Ig

Figura 34

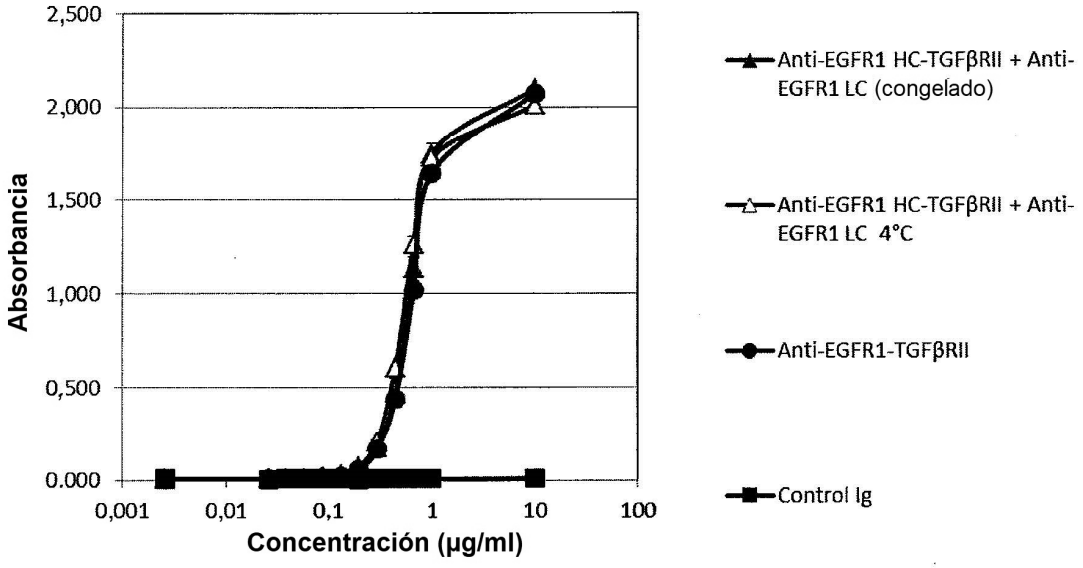

2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0.000
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración (µg/ml)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC 4°C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 35

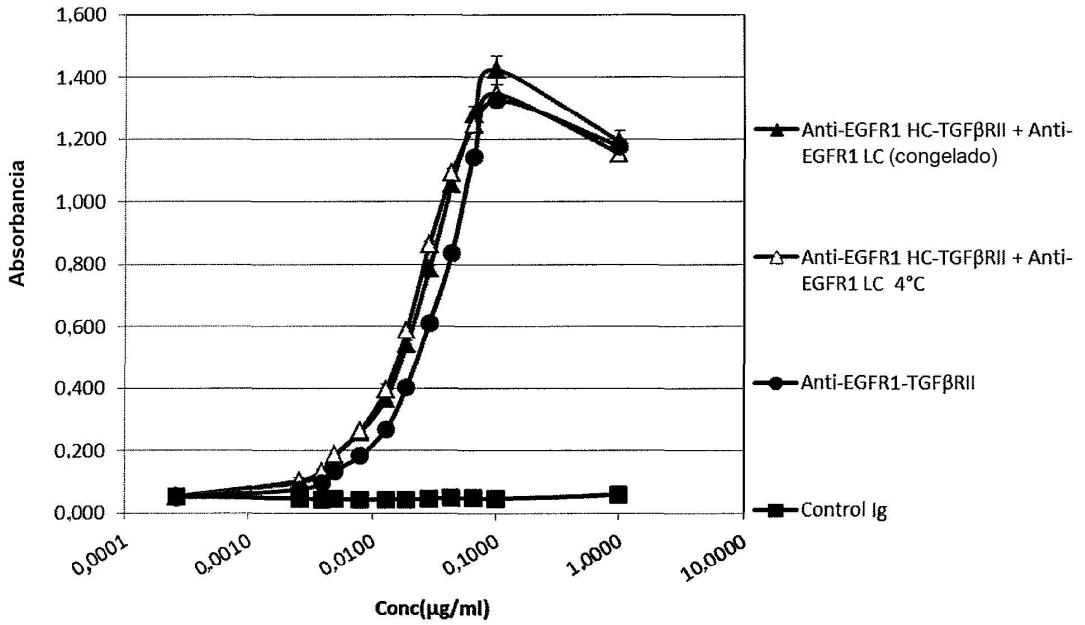

1,600
1,400
1,200
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
Absorbancia
0,0001
0,0010
0,0100
0,1000
1,0000
10,0000
Conc(µg/ml)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC 4°C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 36

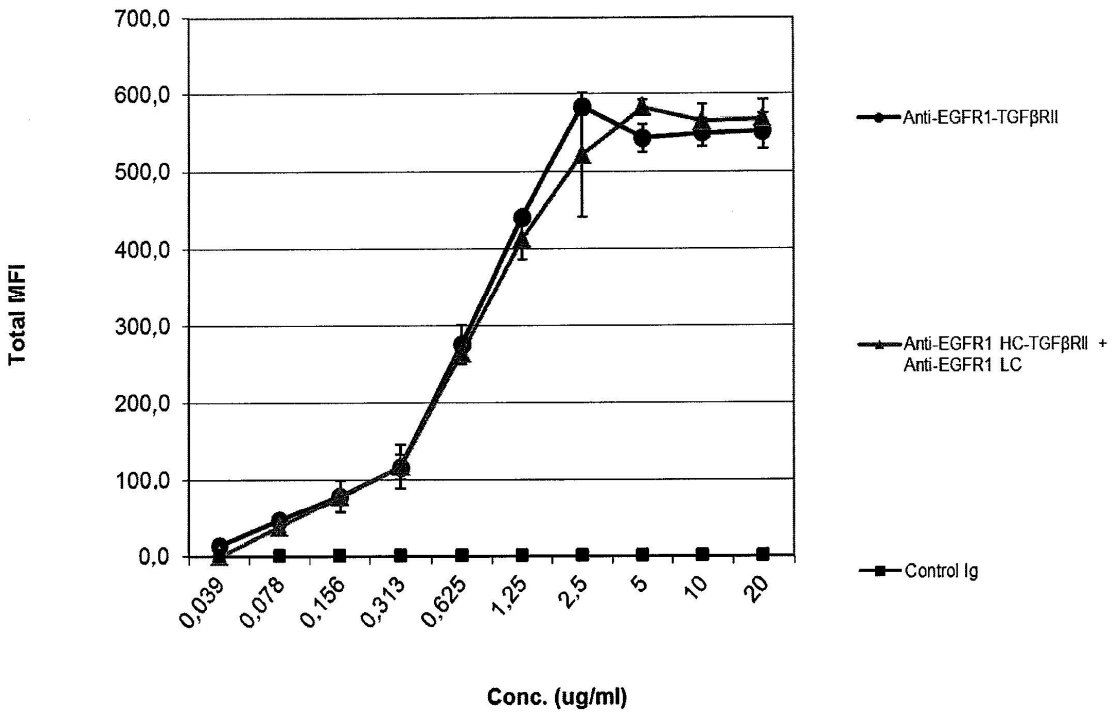

700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
Total MFI
0,039
0,078
0,156
0,313
0,625
1,25
2,5
5
10
20
Conc. (ug/ml)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC
Control Ig

Figura 37

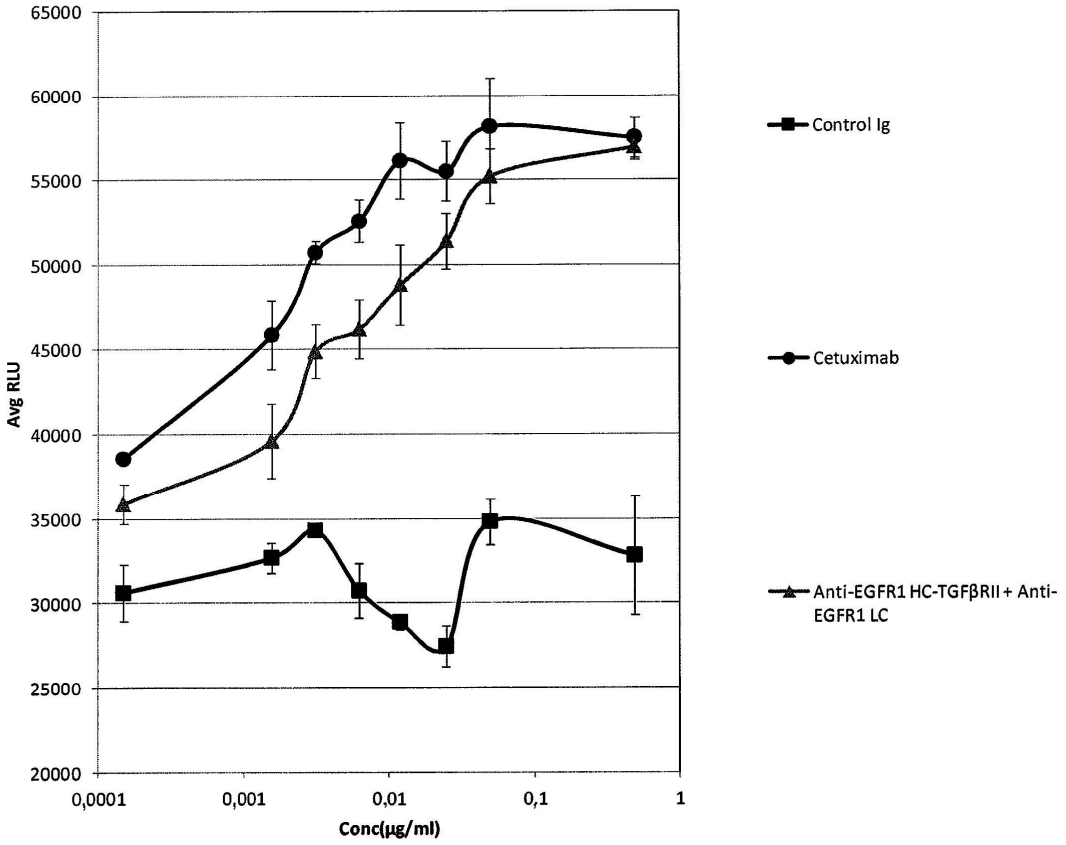

65000
60000
55000
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
Avg RLU
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
Conc(µg/ml)
Control Ig
Cetuximab
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + Anti-EGFR1 LC

Figura 38

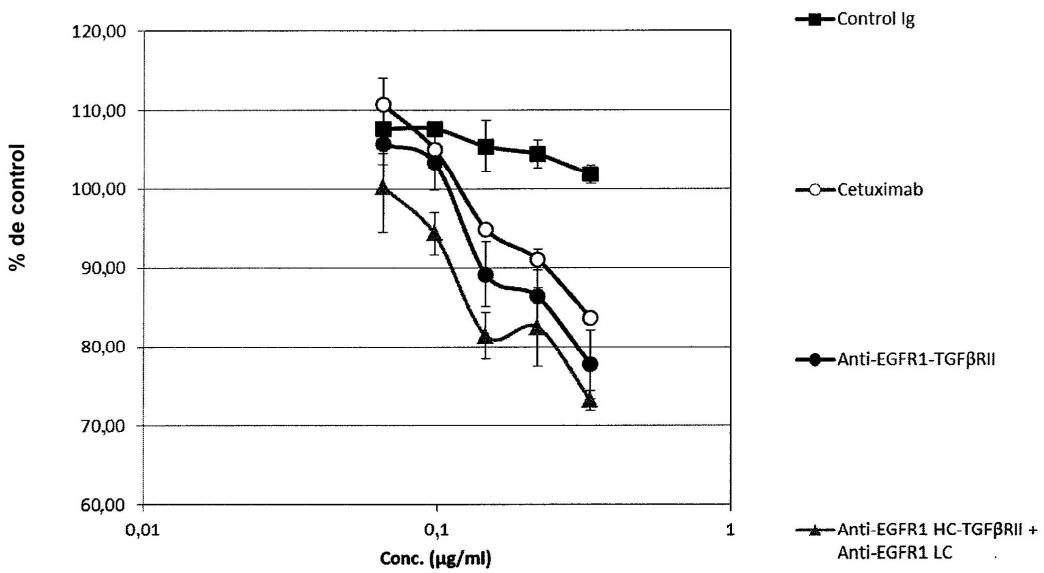

120,00
110,00
100,00
90,00
80,00
70,00
60,00
% de control
0,01
0,1
1
Conc. (µg/ml)
Control Ig
Cetuximab
Anti-EGFR1-TGFβRII
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII +
Anti-EGFR1 LC

Figura 39

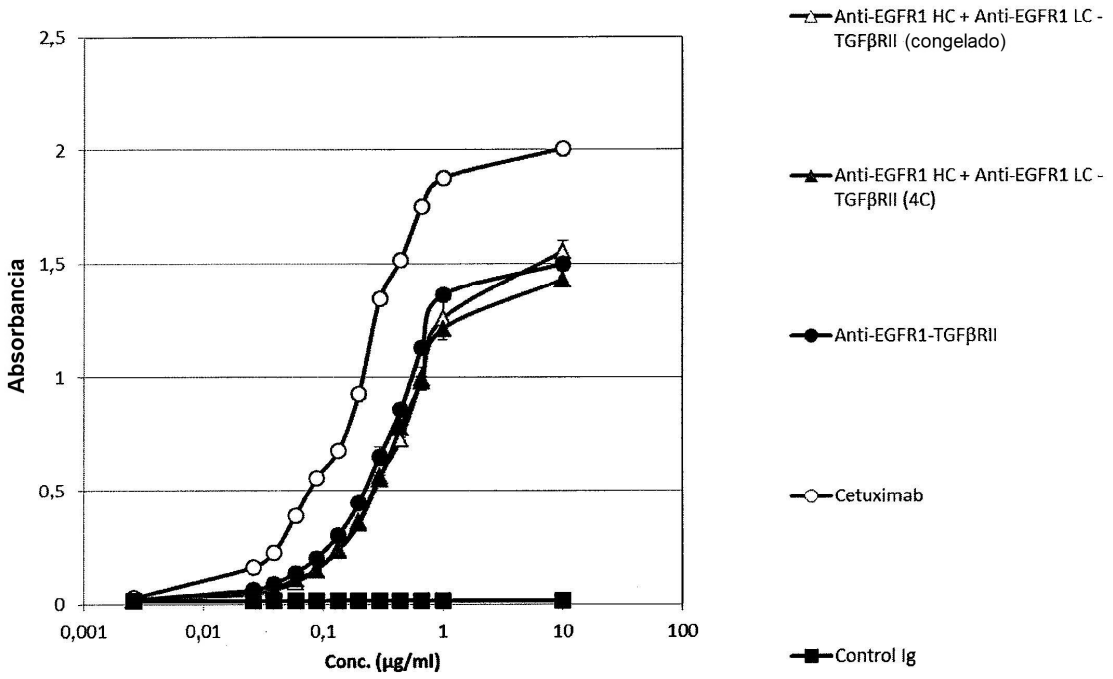

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc. (µg/ml)
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII (congelado)
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII (4C)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Cetuximab
Control Ig

Figura 40

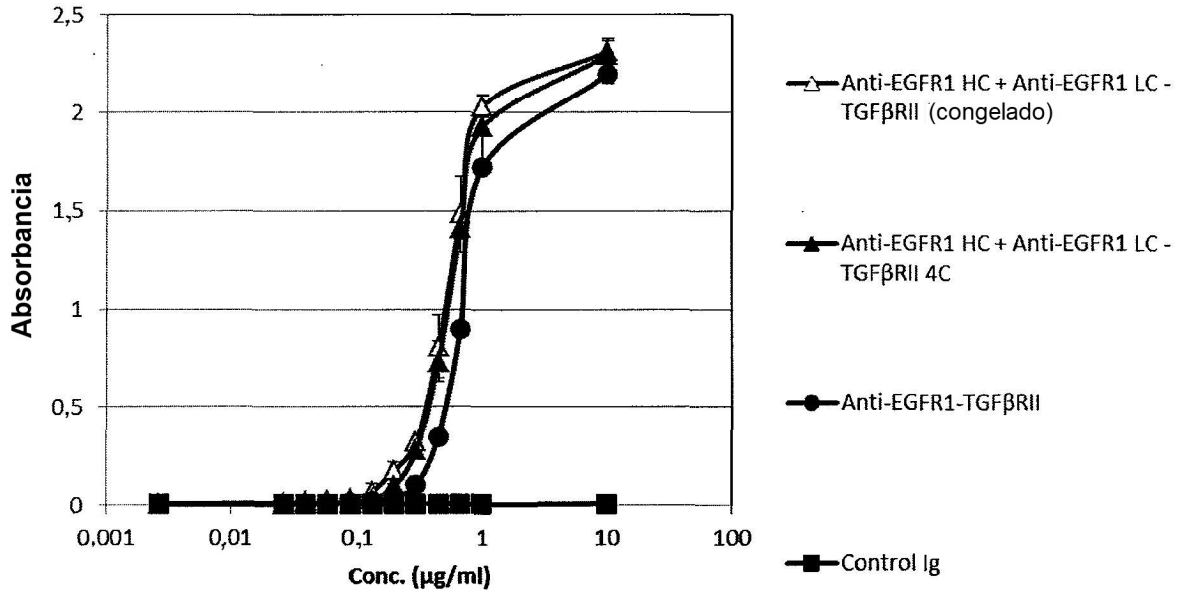

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc. (µg/ml)
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII (congelado)
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII 4C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 41

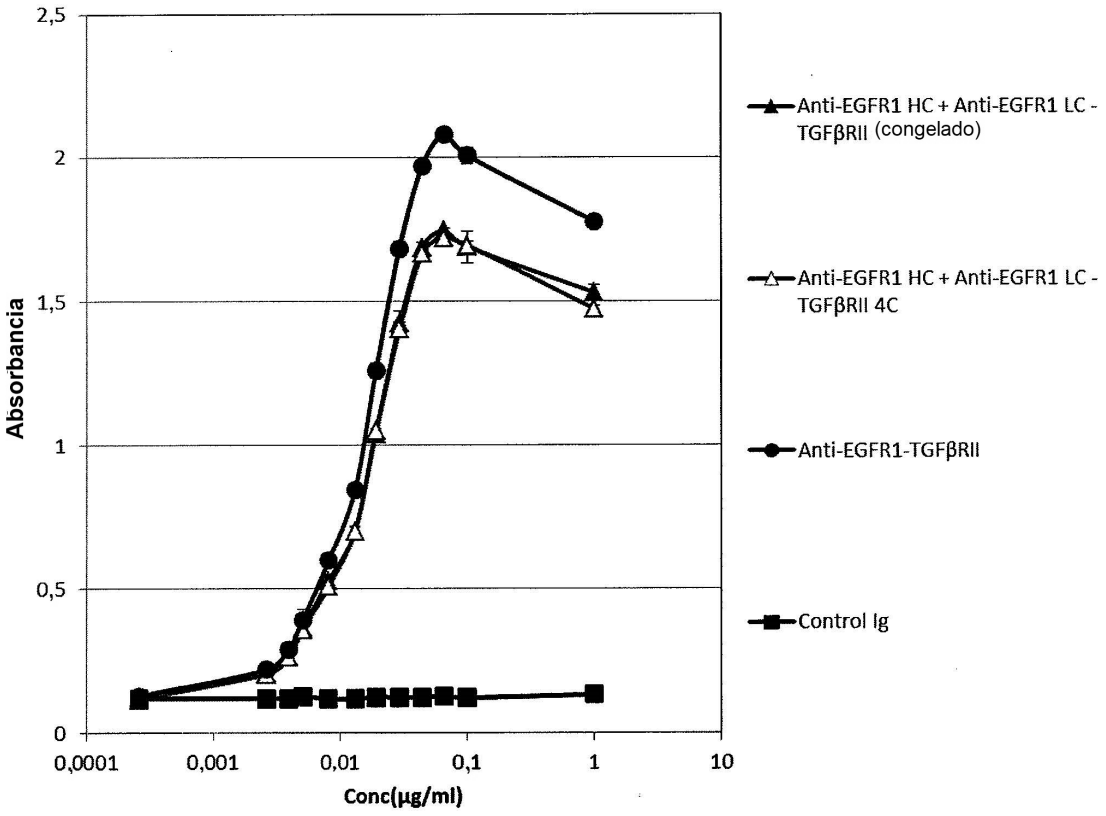

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc(µg/ml)
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII (congelado)
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII 4C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 42

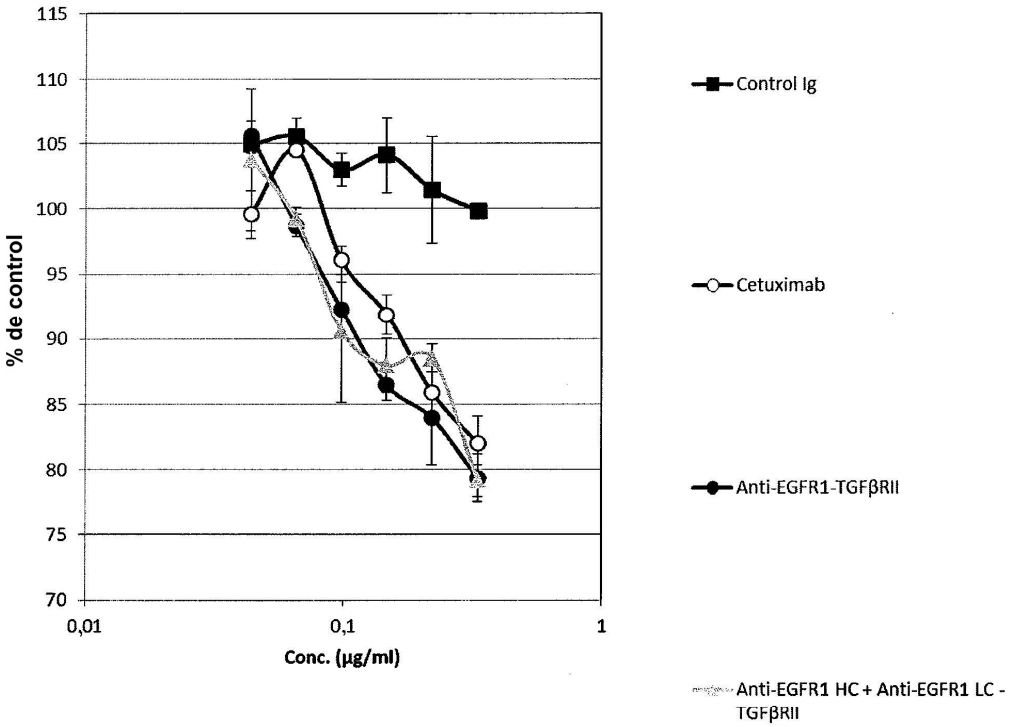

115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
% de control
0,01
0,1
1
Conc. (µg/ml)
Control Ig
Cetuximab
Anti-EGFR1-TGFβRII
Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC - TGFβRII

Figura 43

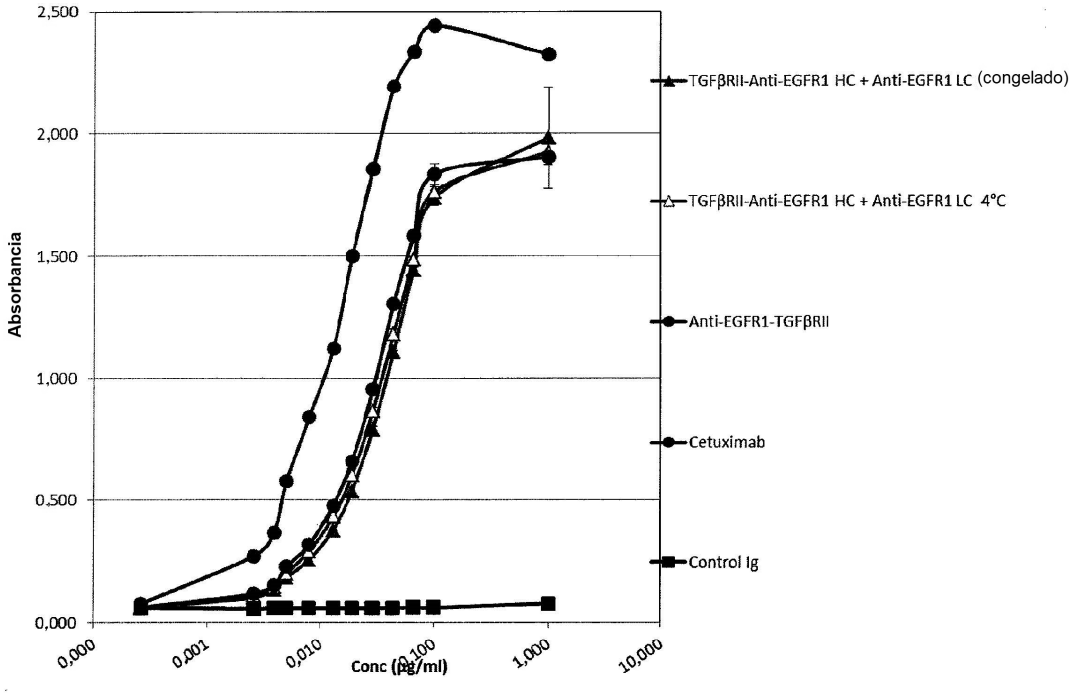

2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Absorbancia
0,000
0,001
0,010
0,100
1,000
10,000
Conc (µg/ml)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (congelado)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC 4°C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Cetuximab
Control Ig

Figura 44

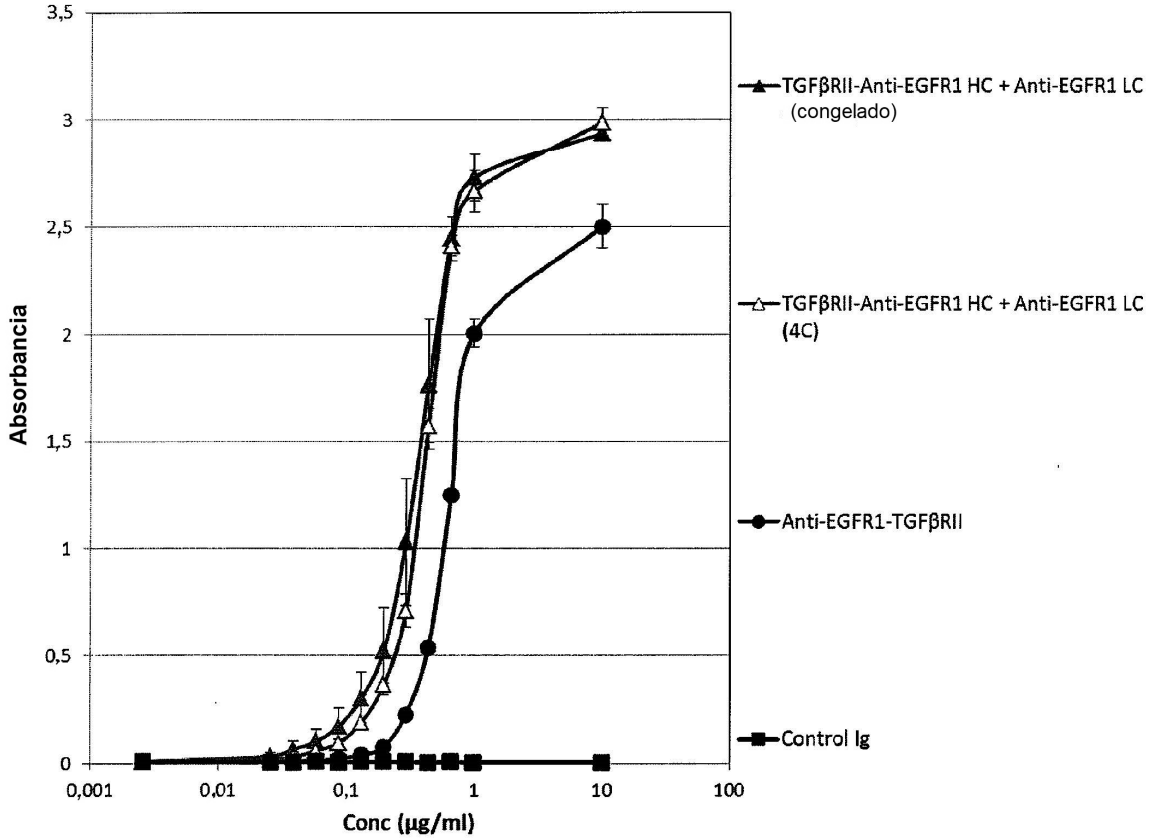

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc (µg/ml)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (congelado)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (4C)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 45

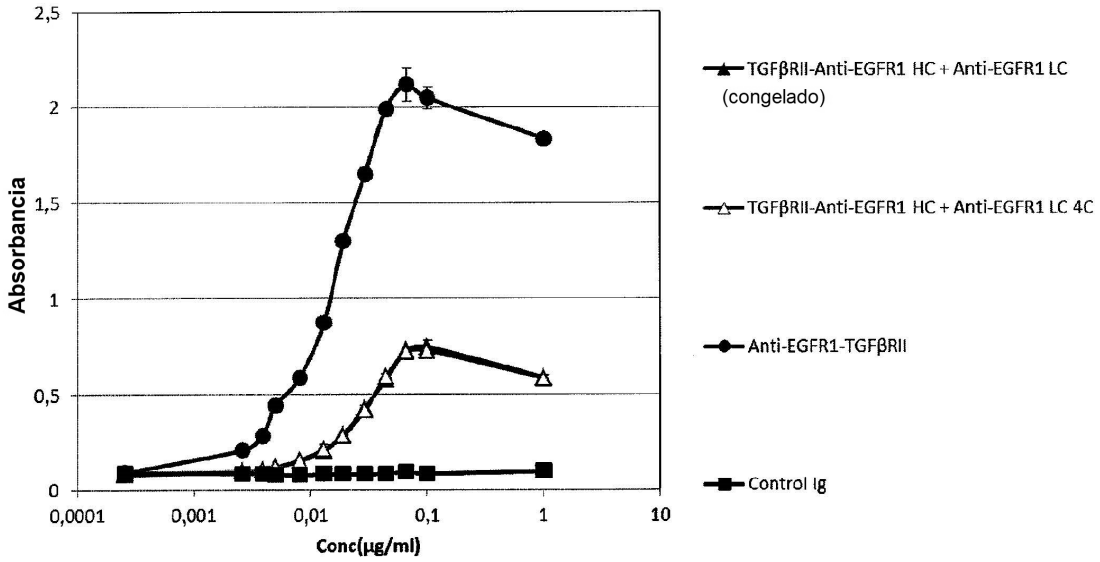

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc(µg/ml)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC (congelado)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC 4C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 46

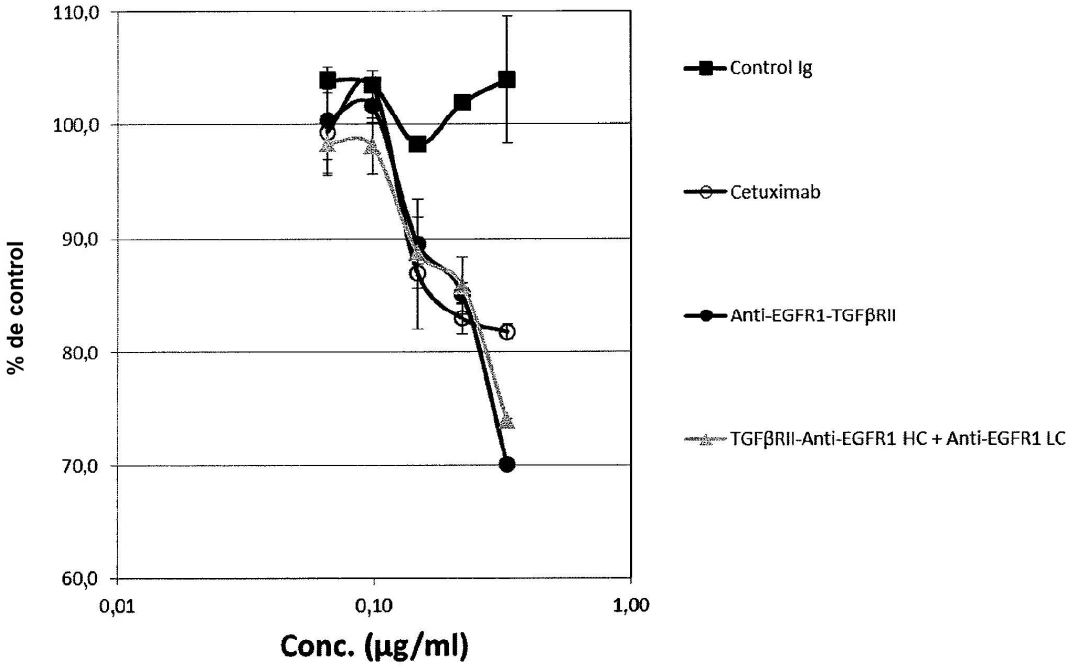

110,0
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
% de control
0,01
0,10
1,00
Conc. (µg/ml)
Control Ig
Cetuximab
Anti-EGFR1-TGFβRII
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + Anti-EGFR1 LC

Figura 47

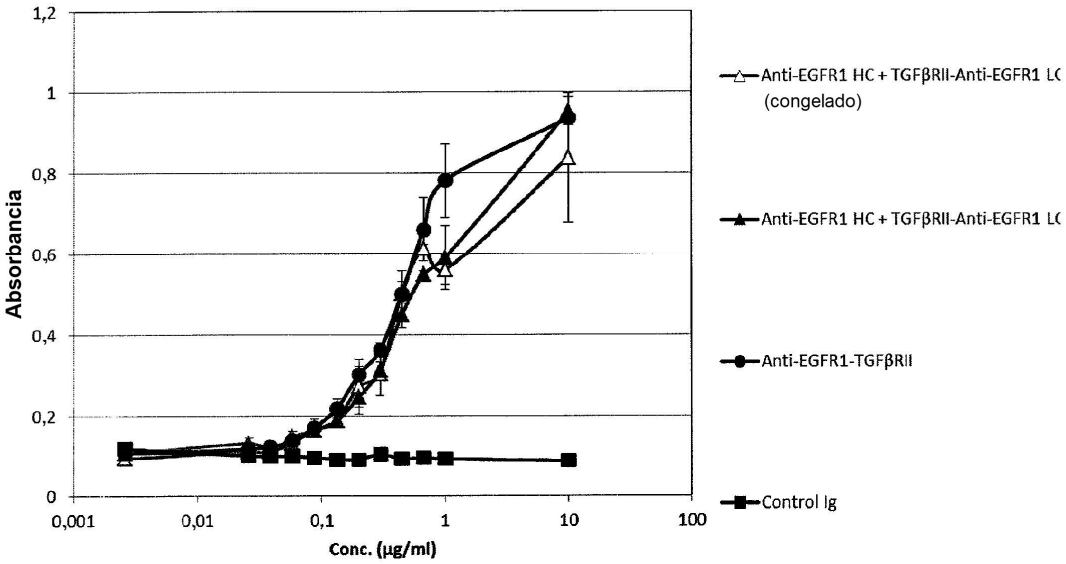

1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc. (µg/ml)
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 48

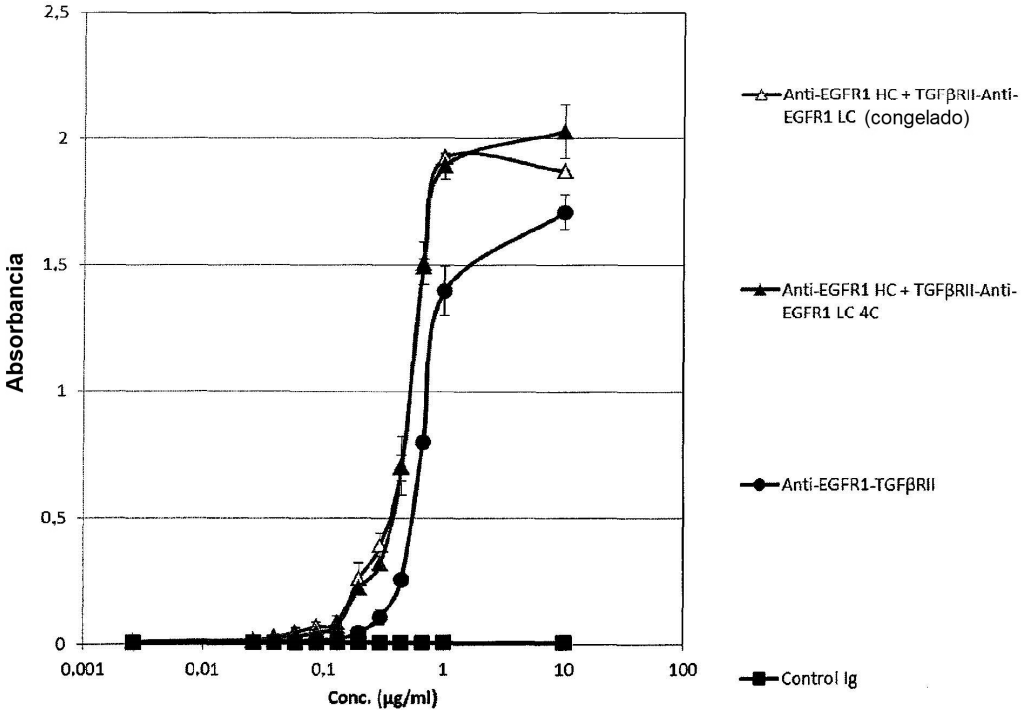

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc. (µg/ml)
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC 4C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 49

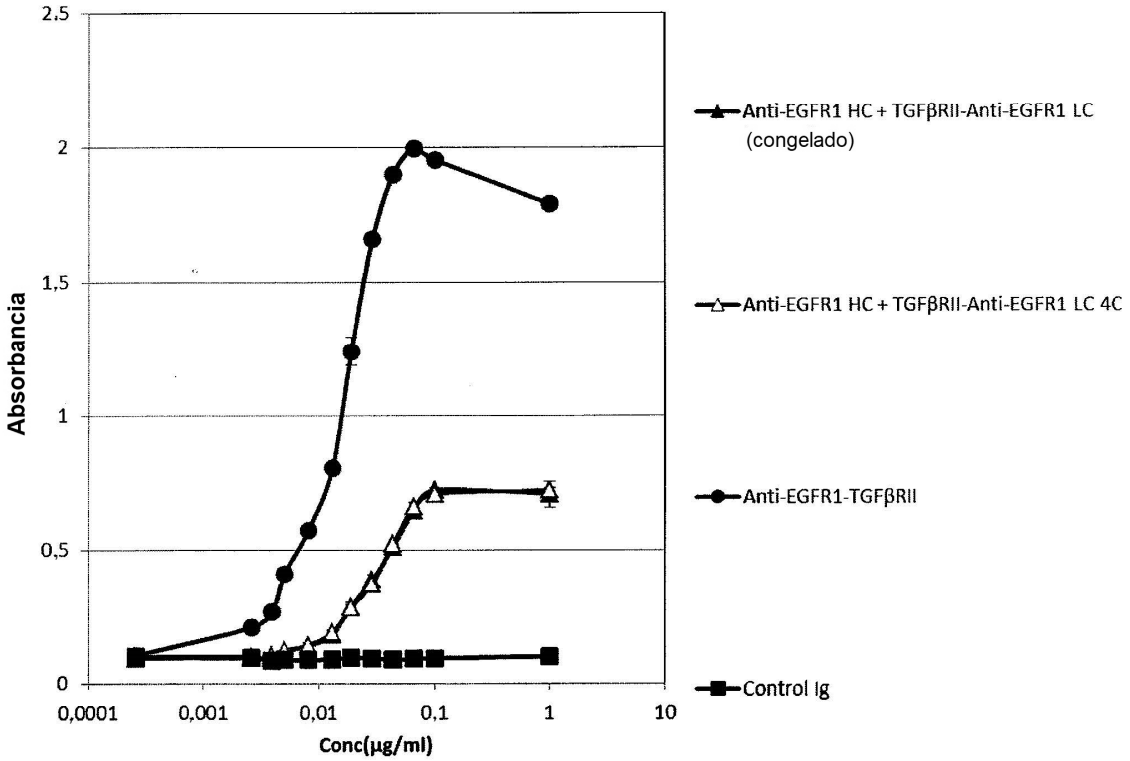

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc(µg/ml)
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC 4C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 50

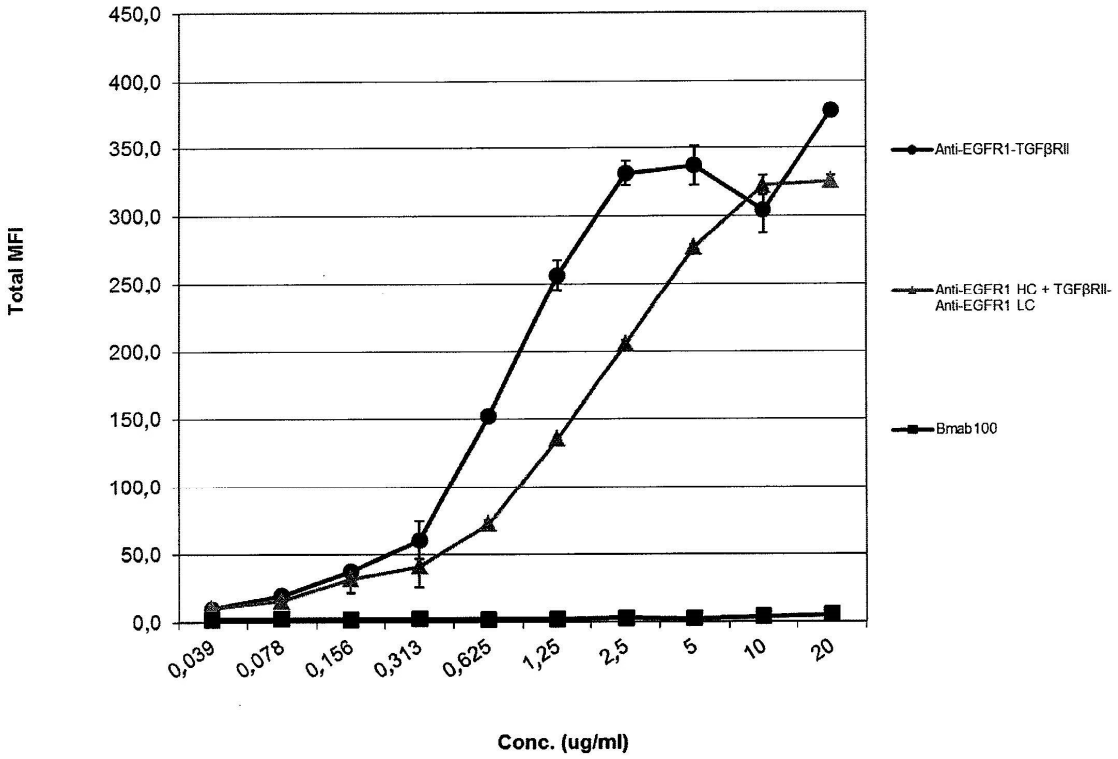

450,0
400,0
350,0
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
Total MFI
0,039
0,078
0,156
0,313
0,625
1,25
2,5
5
10
20
Conc. (ug/ml)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC
Bmab100

Figura 51

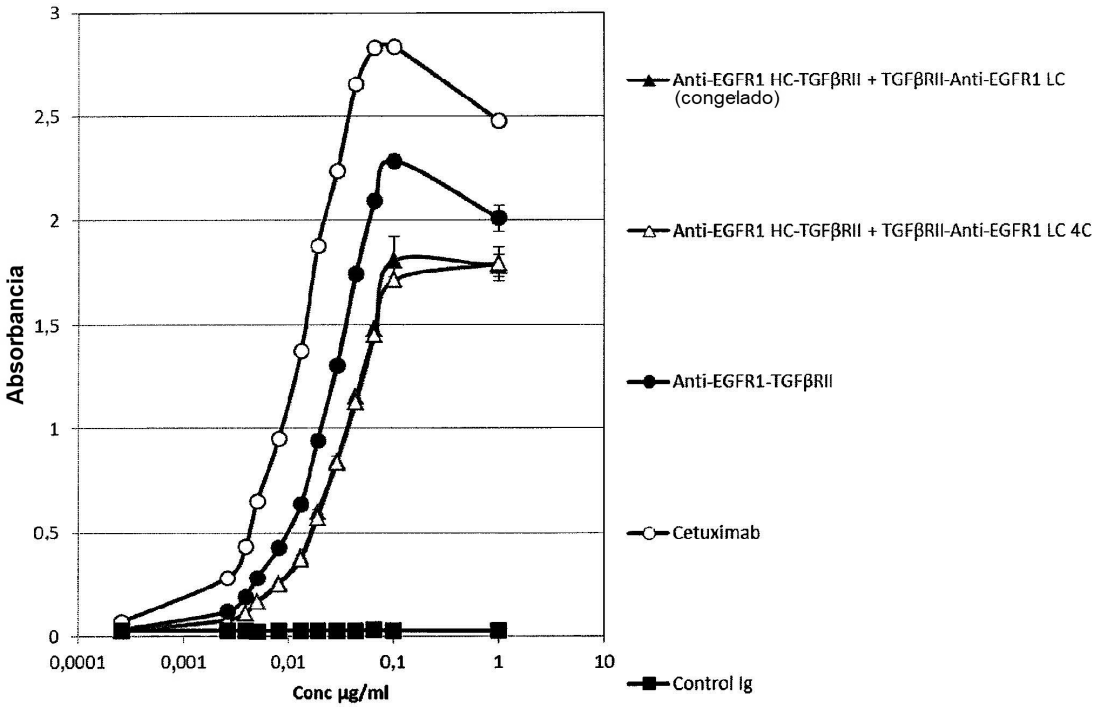

Absorbancia
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc µg/ml
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC 4C
Anti-EGFR1-TGFβRII
Cetuximab
Control Ig

Figura 52

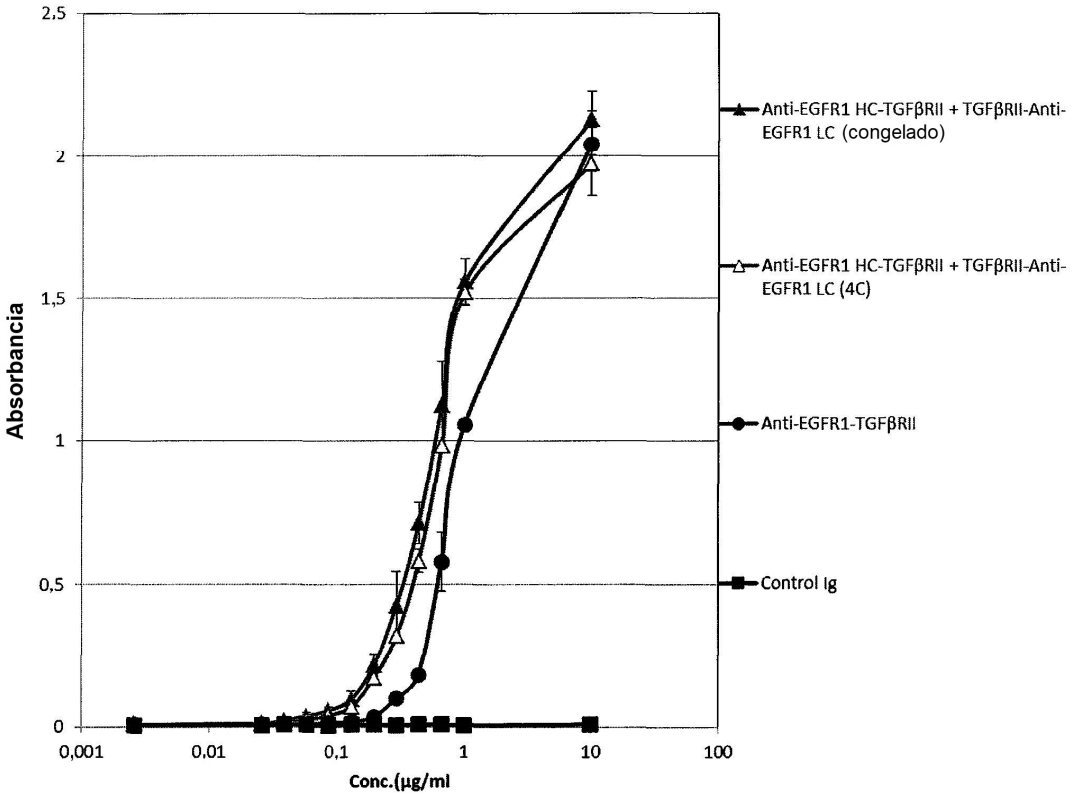

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc.(µg/ml
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (4C)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 53

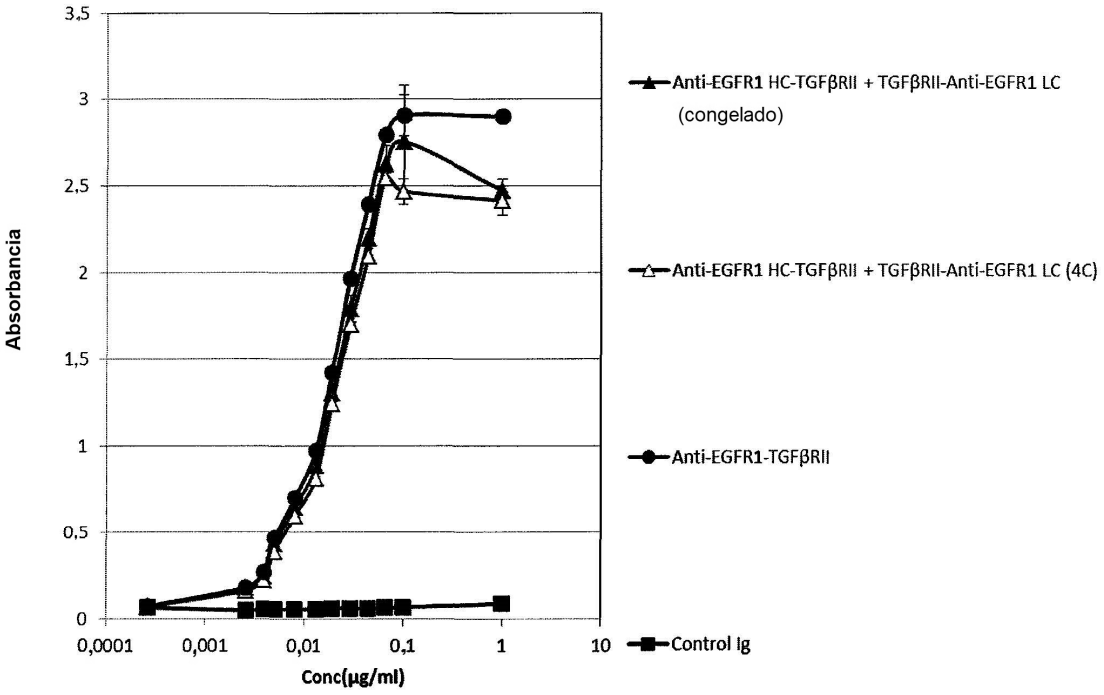

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc(µg/ml)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
Anti-EGFR1 HC-TGFβRII + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (4C)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 54

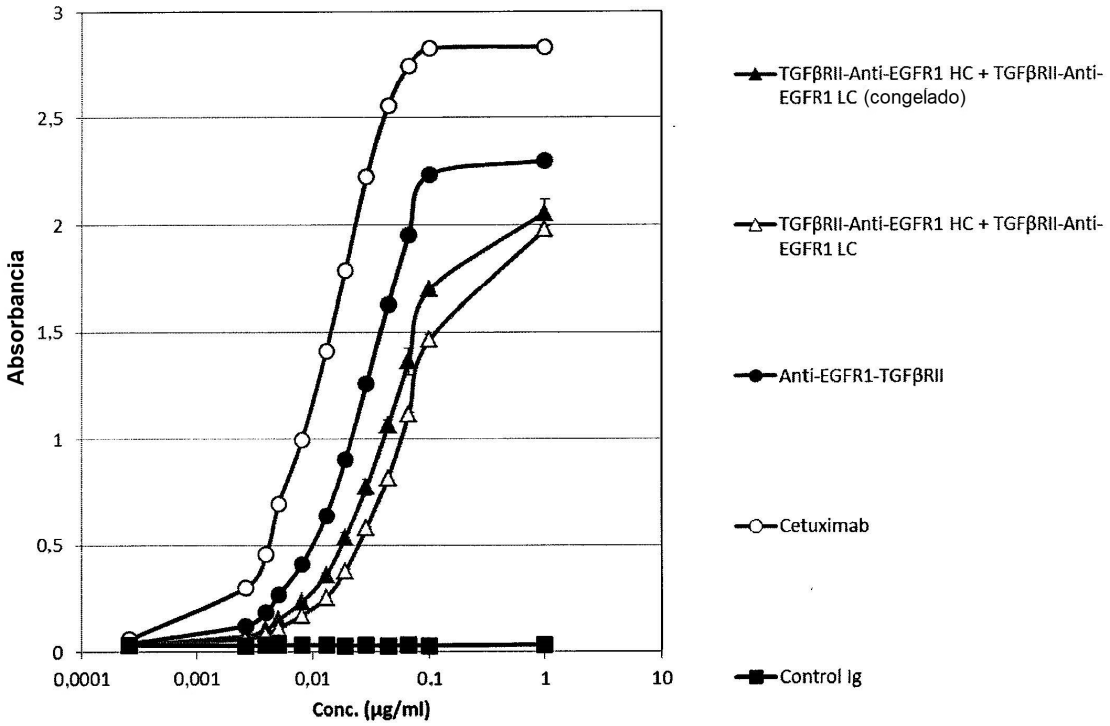

3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,0001
0,001
0,01
0.1
1
10
Conc. (µg/ml)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC
Anti-EGFR1-TGFβRII
Cetuximab
Control Ig

Figura 55

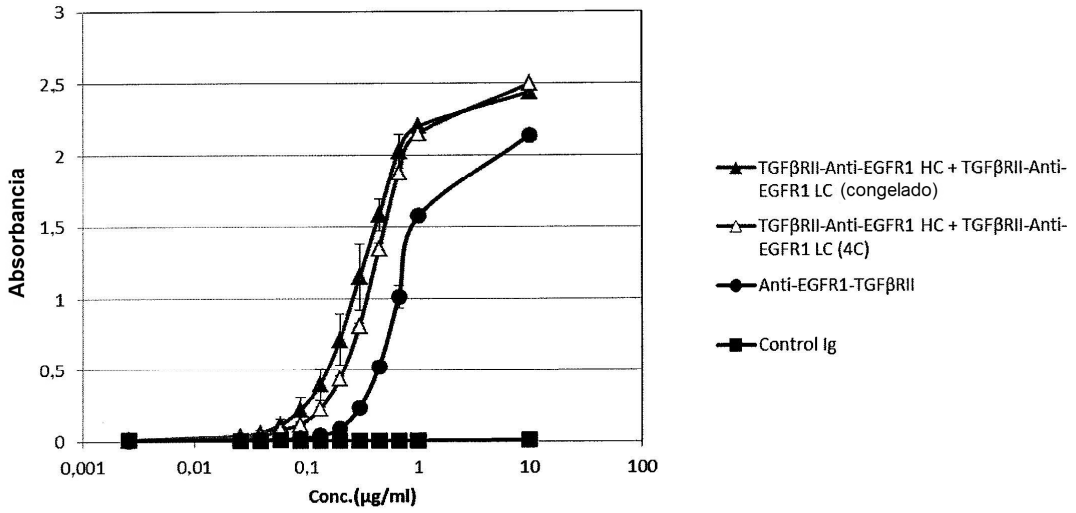

3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc.(µg/ml)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (4C)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 56

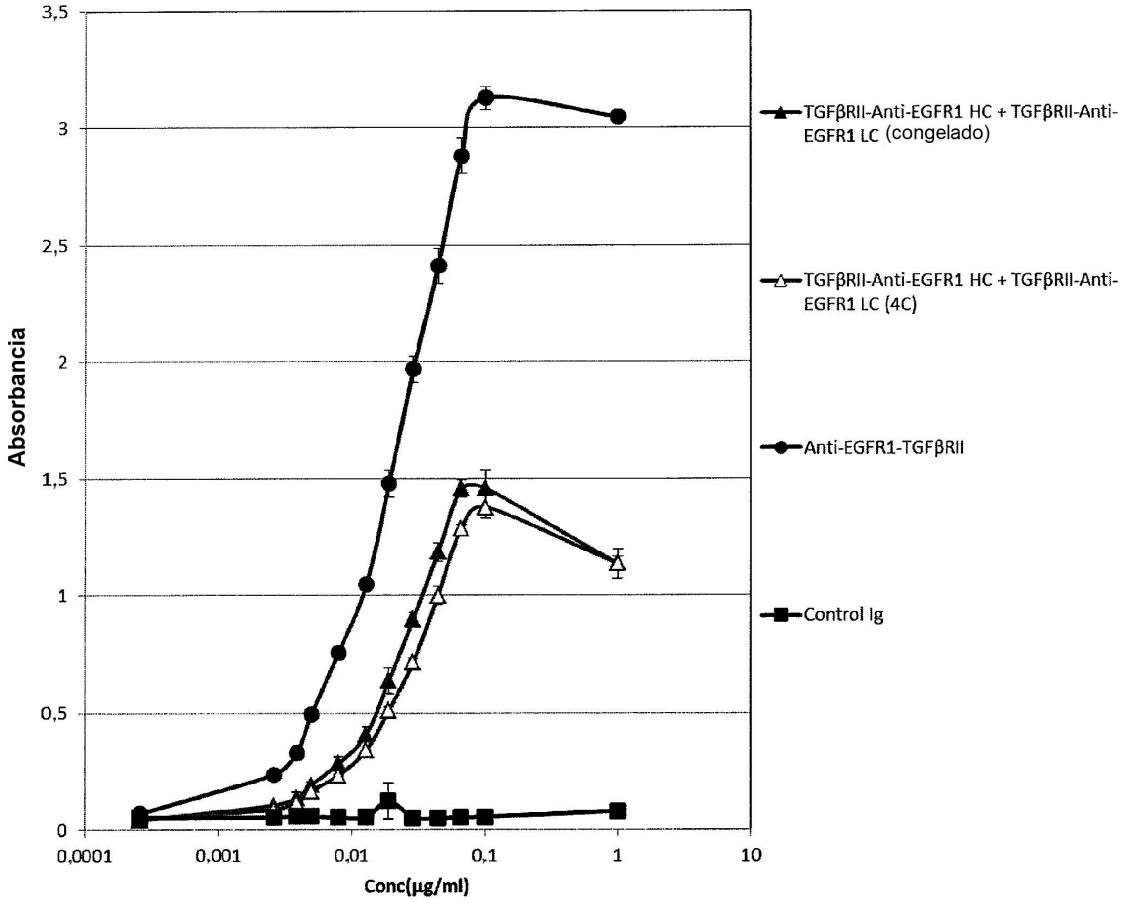

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbancia
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc(µg/ml)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (congelado)
TGFβRII-Anti-EGFR1 HC + TGFβRII-Anti-EGFR1 LC (4C)
Anti-EGFR1-TGFβRII
Control Ig

Figura 57

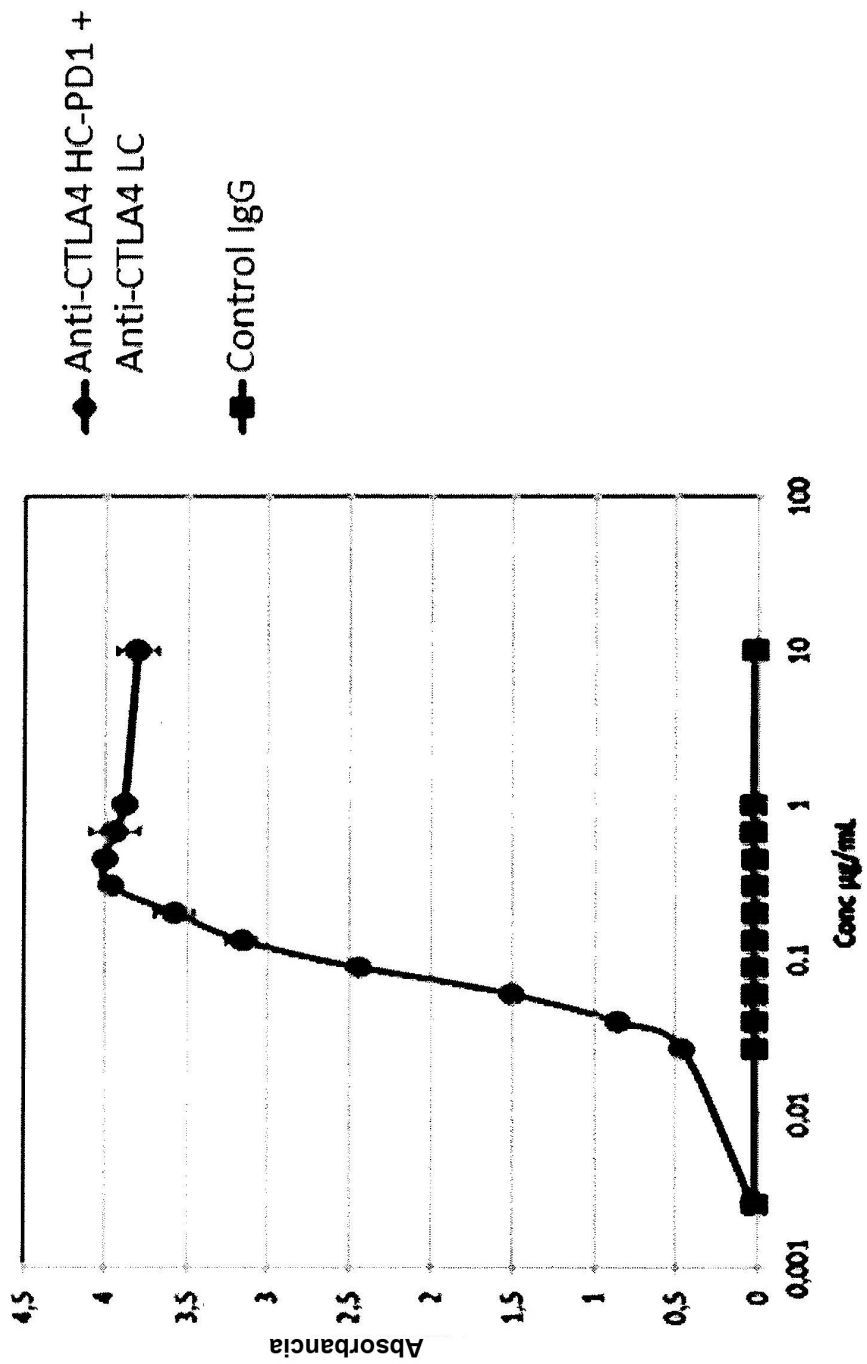

Anti-CTLA4 HC-PD1 +
Anti-CTLA4 LC
Control IgG
Absorbancia
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc µg/mL

Figura 58

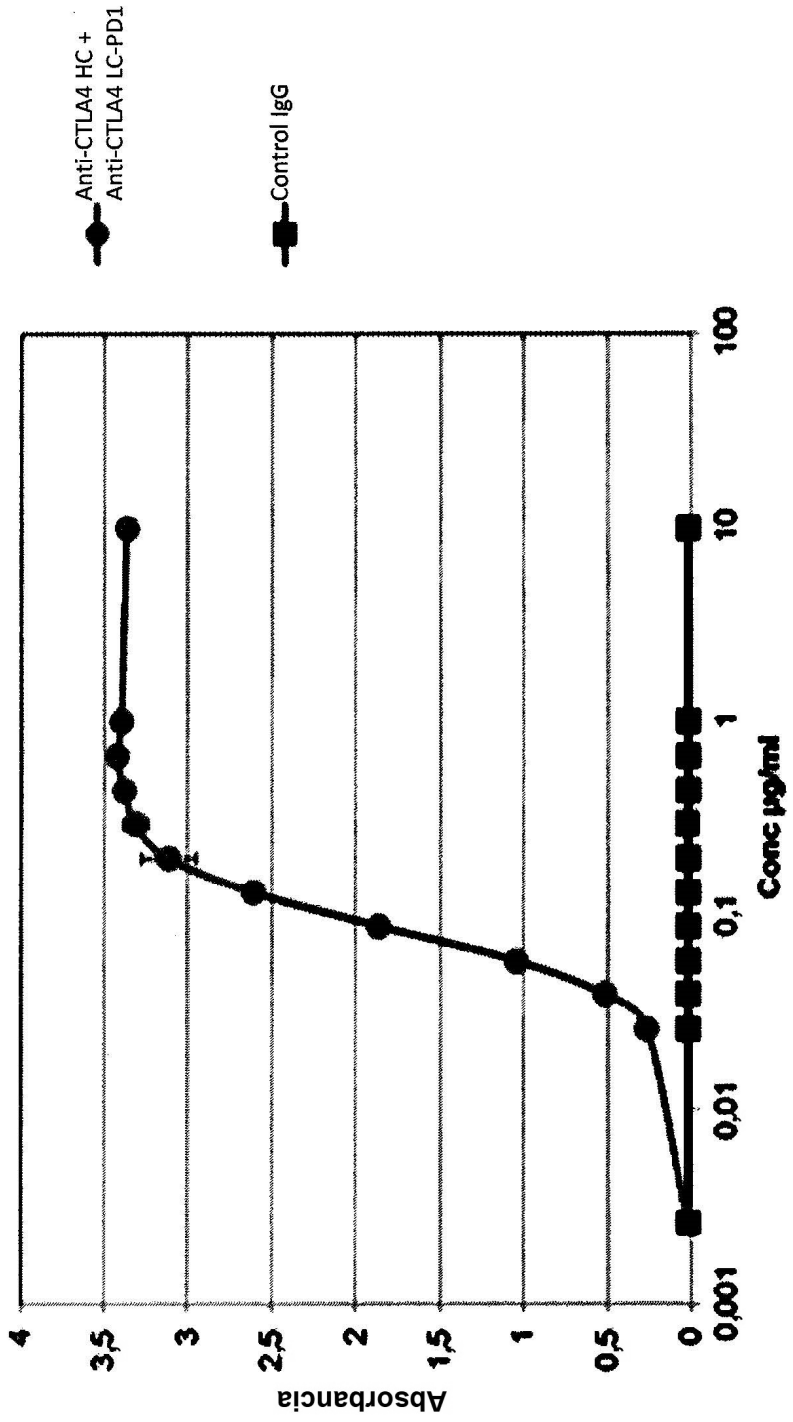

Anti-CTLA4 HC +
Anti-CTLA4 LC-PD1
Control IgG
Absorbancia
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc µg/ml

Figura 59

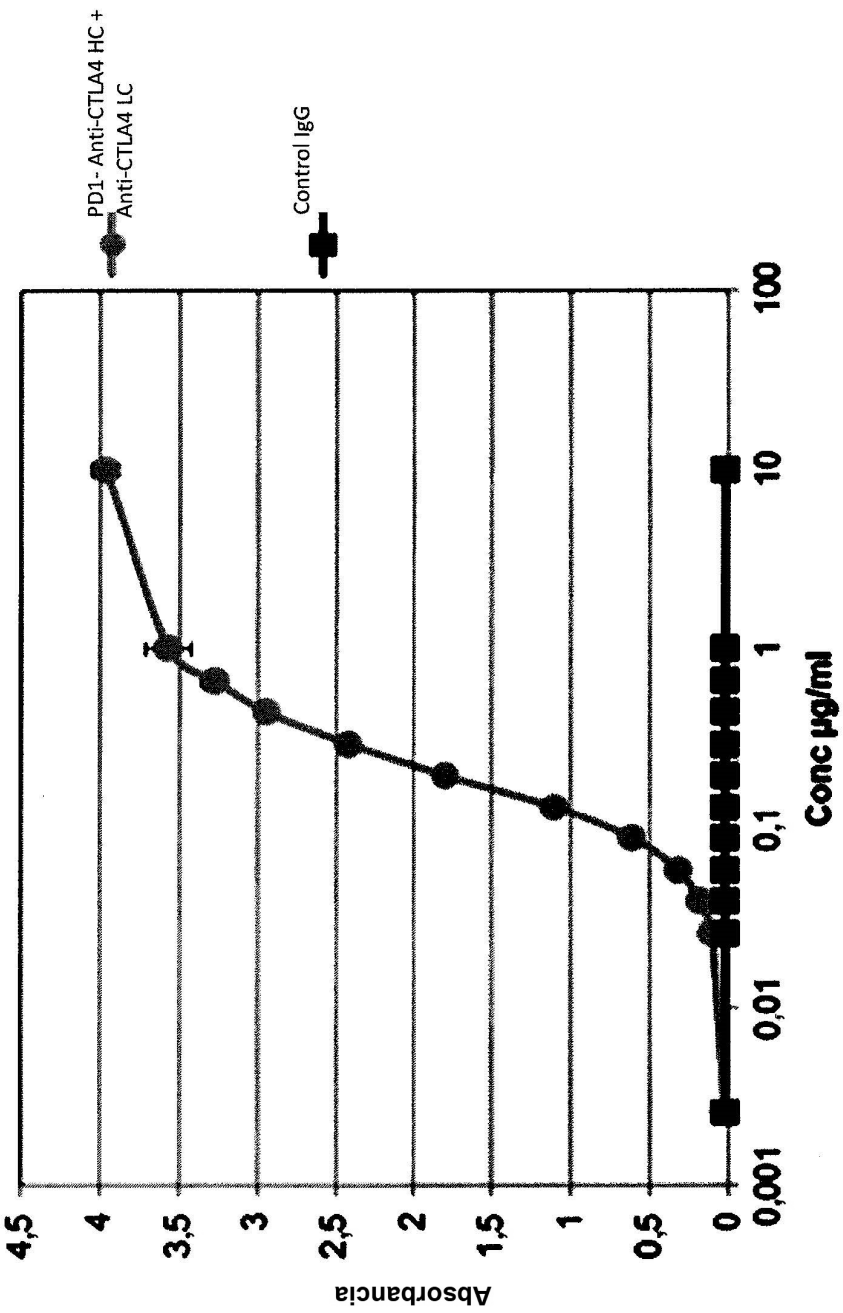

PD1- Anti-CTLA4 HC +
Anti-CTLA4 LC
Control IgG
Absorbancia
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Conc µg/ml

Figura 60

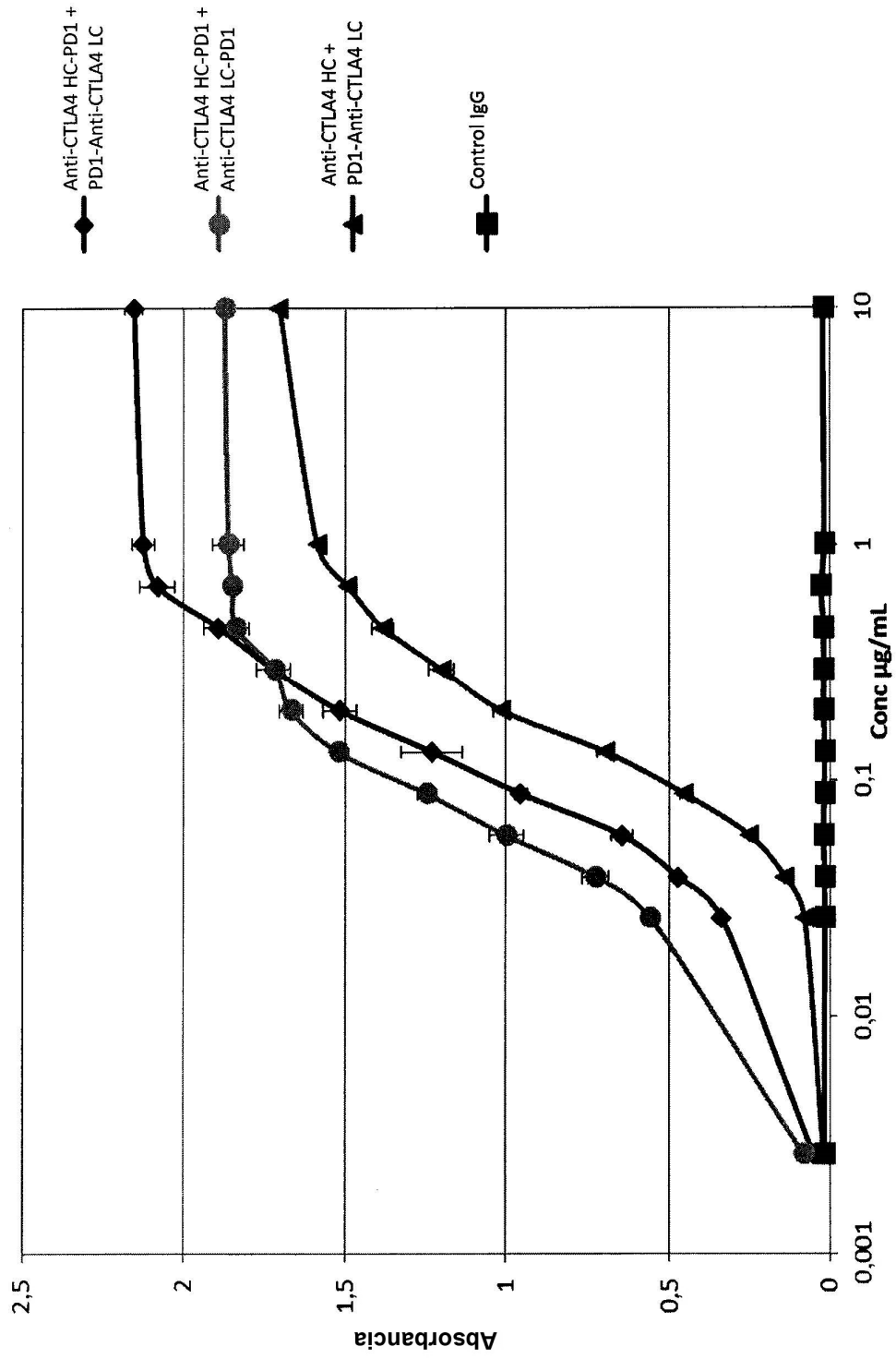

Anti-CTLA4 HC-PD1 + PD1-Anti-CTLA4 LC
Anti-CTLA4 HC-PD1 + Anti-CTLA4 LC-PD1
Anti-CTLA4 HC + PD1-Anti-CTLA4 LC
Control IgG
Absorbancia
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc µg/mL

Figura 61

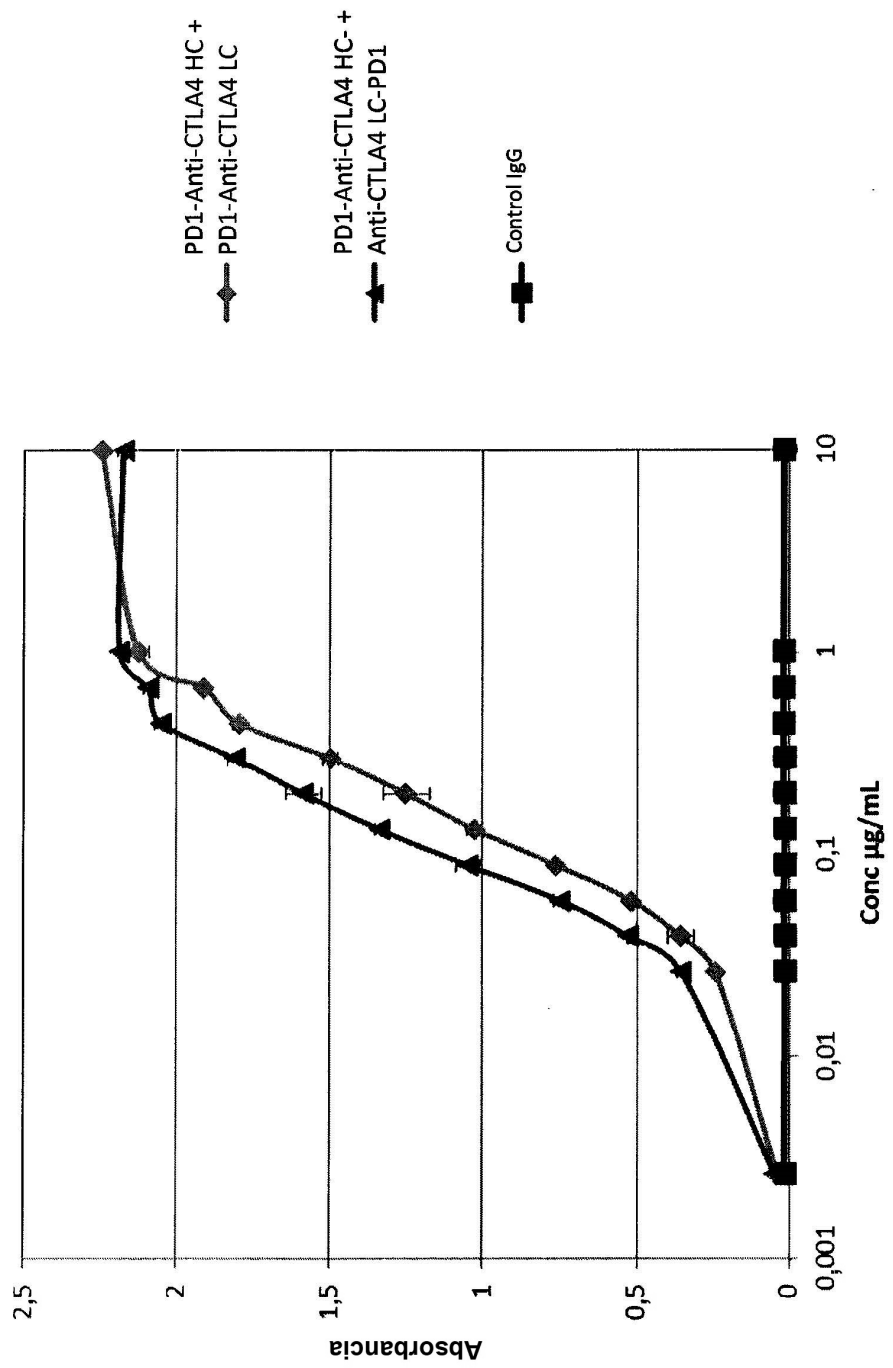

PD1-Anti-CTLA4 HC +
PD1-Anti-CTLA4 LC
PD1-Anti-CTLA4 HC- +
Anti-CTLA4 LC-PD1
Control IgG
Absorbancia
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Conc µg/mL

Figura 62

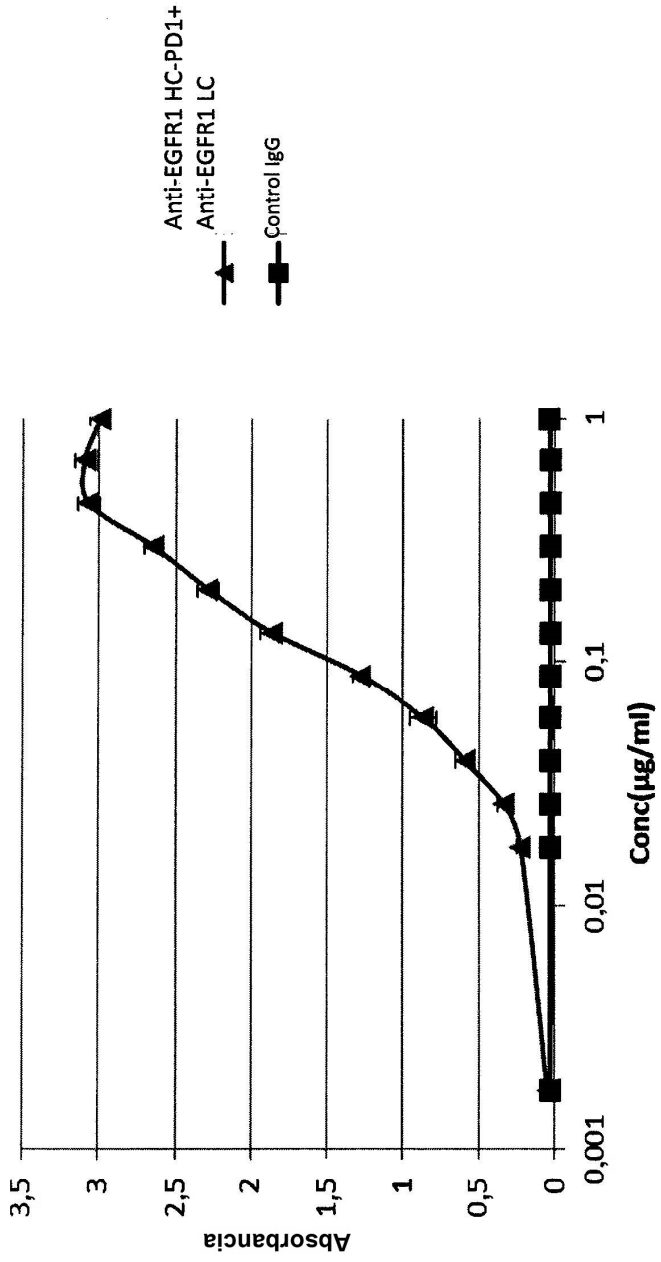

Anti-EGFR1 HC-PD1+
Anti-EGFR1 LC
Control IgG
Absorbancia
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,001
0,01
0,1
1
Conc(µg/ml)

Figura 63

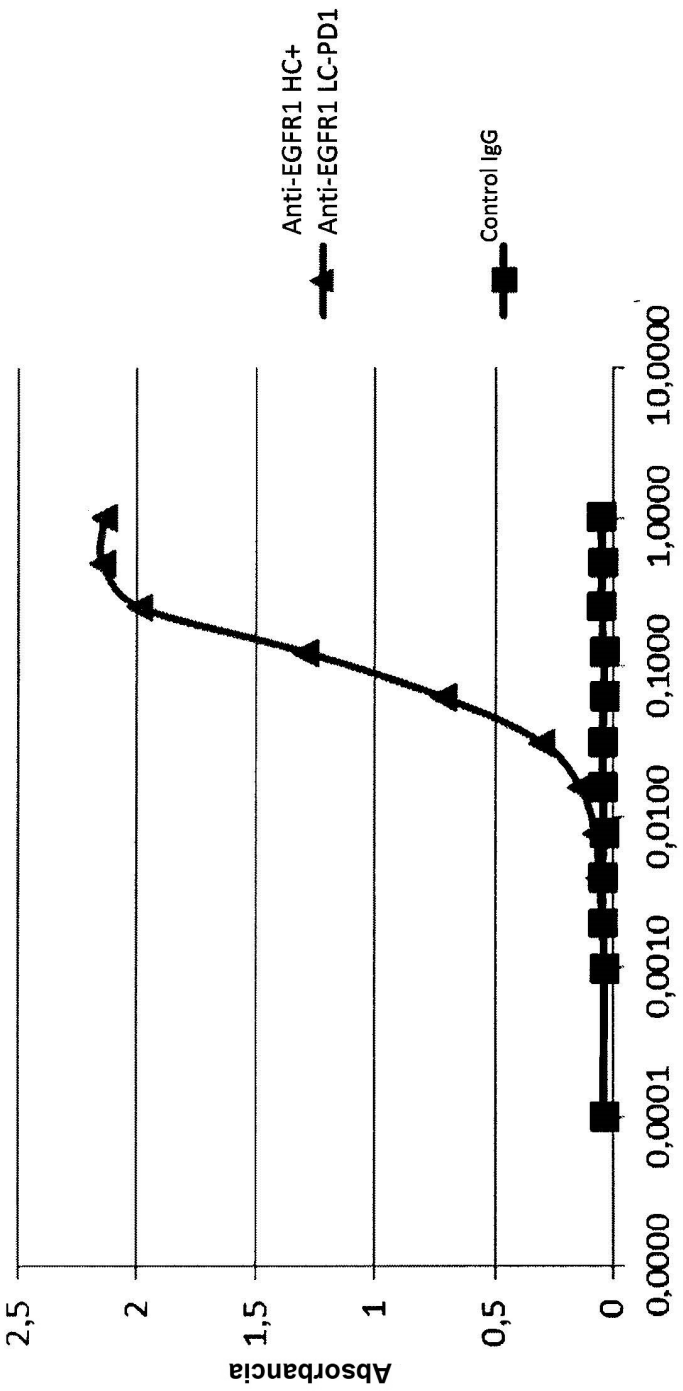

Anti-EGFR1 HC+
Anti-EGFR1 LC-PD1
Control IgG
Absorbancia
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,0000
0,0001
0,0010
0,0100
0,1000
1,0000
10,0000
Conc µg/mL

Figura 64