



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 346 205**

⑯ Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03795898 .0**

⑯ Fecha de presentación : **16.12.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1572748**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

④ Título: **Anticuerpo humanizado (h14.18) del anticuerpo 14.18 de ratón que se enlaza con GD2 y su fusión con la IL-2.**

⑩ Prioridad: **17.12.2002 US 433945 P**

⑦ Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2010

⑦ Inventor/es: **Gillies, Stephen, D. y**
Lo, Kin-Ming

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2010

⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 346 205 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo humanizado (h14.18) del anticuerpo 14.18 de ratón que se enlaza con GD2 y su fusión con la IL-2.

5 Esta invención se refiere, de forma general, a anticuerpos modificados. De una manera más particular, la invención se refiere a anticuerpos modificados con una inmunogenicidad reducida, que se enlazan de manera específica con el glicoesfingolípido GD2 de la superficie de las células humanas, y a su uso como agentes terapéuticos.

Fundamento de la invención

10 Durante años ha habido progresos significativos en el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos. Por ejemplo, los investigadores han identificado, no solamente una variedad de marcadores específicos del cáncer, sino que, también, han identificado una variedad de anticuerpos, que se enlazan de manera específica con dichos marcadores. Los anticuerpos pueden ser usados para suministrar ciertas moléculas, por ejemplo una toxina o una mitad inmunoestimulante, por ejemplo, una citocina, a una célula cancerosa, que exprese el marcador, con el fin de destruir selectivamente a la célula cancerosa.

20 El anticuerpo 14.18 es un anticuerpo monoclonal derivado del ratón, que está dirigido contra el glicoesfingolípido GD2 de la superficie celular. El GD2 es un disialogangliósido, que es expresado normalmente solo a un nivel significativo sobre las membranas de la superficie externa de las células neuronales, en la que su exposición al sistema inmune está limitada por medio de la barrera hematoencefálica.

25 Por el contrario, numerosas células tumorales tienen niveles anormales de expresión de glicoesfingolípido en la superficie celular. Por ejemplo, el GD2 es expresado en las superficies de una gran variedad de células tumorales, con inclusión de los neuroblastomas, de los blastomas medulares, de los astrocitomas, de los melanomas, del cáncer pulmonar microcítico, de los osteosarcomas y de otros sarcomas del tejido blando. De este modo, el GD2 es un marcador específico de los tumores conveniente para dirigir a las células tumorales dominios proteicos inmunoestimulantes, con objeto de provocar una respuesta inmune efectiva contra las células tumorales para llevar a cabo su destrucción. Aún cuando el anticuerpo de ratón 14.18 (anticuerpo m14.18) puede contribuir a dirigir a estos dominios proteicos hacia las células tumorales, sus secuencias de aminoácido, derivadas del ratón, pueden menoscabar el deseado efecto terapéutico.

30 Cuando son administrados a un paciente, los anticuerpos pueden tener una inmunogenicidad asociada en el mamífero huésped. Esto es más probable que ocurra cuando los anticuerpos no son autólogos. Como consecuencia, la eficacia de las terapias basadas en anticuerpos está frecuentemente limitada por una respuesta inmunogénica dirigida contra el anticuerpo terapéutico. Esta respuesta inmunogénica queda acrecentada, de forma típica, cuando el anticuerpo se derive en su totalidad, o en parte, de un mamífero diferente del mamífero huésped, por ejemplo cuando el anticuerpo se derive de un ratón y el receptor sea un ser humano.

40 Para el uso clínico en seres humanos podría ser adecuado llevar a cabo una modificación de los anticuerpos derivados del ratón para proporcionar anticuerpos que se parezcan más a los humanos de tal manera, que se reduzca o que se minimice la inmunogenicidad del anticuerpo derivado del ratón. La inmunogenicidad del anticuerpo derivado del ratón puede ser reducida por medio de la generación de un anticuerpo químico, en el que las regiones constantes de un anticuerpo humano estén fusionadas con los dominios variables del ratón. Sin embargo, los dominios variables del ratón, remanentes, siguen siendo generalmente todavía inmunogénicos en los seres humanos y, por consiguiente, pueden menoscabar la eficacia de una terapia basada en anticuerpos.

45 Algunos intentos destinados a reducir la inmunogenicidad, tales como el “chapeado” y la “humanización” comprenden la introducción de un gran número de substituciones de aminoácidos y pueden interrumpir el enlace de un anticuerpo con un antígeno. El anticuerpo m14.18 se enlaza con el GD2 con una afinidad moderada. Por consiguiente, se espera que las mutaciones que disminuyan de manera significativa la afinidad del m14.18 con respecto al GD2, hagan que este sea menos efectivo para finalidades terapéuticas en seres humanos. Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de anticuerpos terapéuticos, que puedan hacer blanco de manera efectiva en el GD2 y que tengan una inmunogenicidad reducida cuando sean administrados a seres humanos.

55 La publicación WO 01/23573 y las publicaciones Derwent AN 2001-266163 XP002280627 (Kyowa Hakko Kogyo KK) describen un anticuerpo anti-GD2 químico recombinante específico con baja inmunoantigenicidad.

60 La publicación WO 02/066514 (Merck Patent GmbH) describe numerosas versiones del mAb 14.18, que han sido desinmunizadas por medio de la eliminación de epitopos de células T a partir del anticuerpo parental murino, de conformidad con un método informático específico. La solicitud de patente describe, sin indicación de datos biológicos, proteínas de fusión respectivas de anticuerpos 14.18 desinmunizados con la IL-2.

Breve descripción de la invención

65 De manera general, la presente invención proporciona una proteína de fusión, que comprende una forma modificada del anticuerpo m14.18, que es menos inmunogénica en los seres humanos pero que todavía mantiene la afinidad de enlace del m 14.18 con el GD2 humano.

ES 2 346 205 T3

5 De una manera más particular, la invención proporciona una proteína de fusión, que comprende una forma humanizada del anticuerpo m14.18 (anticuerpo hu14.18) en el que han sido substituidos varios aminoácidos específicos del ratón, en una o en varias regiones marco, por diversos aminoácidos con objeto de reducir su inmunogenicidad en los seres humanos. La invención proporciona fusiones del anticuerpo hu14.18 con una o más mitades no inmunoglobulina, preferentemente con la IL-2 para reforzar los efectos de la terapia inmune dirigida.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona una región variable de anticuerpo, que incluye la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1, que define una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (región V_L). En otro aspecto, la invención se refiere a una región variable de anticuerpo, que incluye la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2, que define una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (región V_H). En una realización, la invención proporciona una región variable de anticuerpo, en la que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 está enlazada con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de aminoácidos pueden estar enlazadas, tal como por medio de un enlace de disulfuro o por medio de un enlace peptídico.

15 20 En otro aspecto, la invención se refiere a una región variable de anticuerpo, se que enlaza de manera específica con el GD2 y que incluye, al menos, los aminoácidos 1-23 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 1-25 de la SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 67-98 de la SEQ ID NO: 2. Estas secuencias definen regiones marco en las regiones variables de inmunoglobulina del anticuerpo hu14.18. Las regiones marco están descritas con mayor detalle más adelante.

25 Un aspecto de la invención se refiere a un método para dirigir una célula con GD2 en su superficie e incluye la administración a un paciente de una región variable de anticuerpo de la presente invención. En una realización, la célula diana es una célula tumoral. Otros aspectos de la invención incluyen un ácido nucleico, que codifica la región variable del anticuerpo o una célula, que incluye este ácido nucleico, que puede ser administrado a un paciente o bien que puede ser utilizado para una producción de proteínas *in vitro*.

30 De la misma manera, la invención proporciona un polipéptido, que incluye una región variable de anticuerpo de la invención y una porción Fc, que comprende, al menos, un dominio CH2, ácidos nucleicos, que codifican al polipéptido, células, que incluyen los ácidos nucleicos, y métodos para dirigir una célula con GD2 en su superficie por medio de la administración a un paciente del polipéptido, del ácido nucleico o de la célula. En algunas realizaciones de la invención, la porción Fc se deriva de la IgG1.

35 La región variable del anticuerpo está enlazada, con o sin una porción Fc interviniente, con una mitad no inmunoglobulina. De manera específica, la mitad no inmunoglobulina es una citocina.

40 Debe entenderse que las características de las diversas realizaciones aquí descritas no son mutuamente excluyentes y que pueden existir en diversas combinaciones y permutaciones.

45 **Descripción de los dibujos**

La figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

45 La figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

50 Las figuras 2A-D muestran la secuencia de nucleótidos de un vector de expresión, que incluye los constructos de ácido nucleico, que codifican una proteína de fusión de una cadena ligera de inmunoglobulina y de una cadena pesada de inmunoglobulina-IL-2, de conformidad con la invención.

55 La figura 3A muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

55 La figura 3B muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

60 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona una proteína de fusión, que comprende una forma modificada del anticuerpo m14.18, que es menos inmunogénica en seres humanos, pero que todavía es capaz de enlazarse de forma específica con el GD2 humano. La inmunogenicidad reducida es proporcionada por uno o varias secuencias alteradas de aminoácidos en los dominios variables de la inmunoglobulina. El anticuerpo es adecuado para llevar a cabo el tratamiento de tumores positivos al GD2, de manera particular cuando esté fusionado con una citocina o con otro inmunomodulador.

Se entenderá que los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina”, tal como son usados aquí, quieren indicar (i) un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal), (ii) porciones de los mismos que se enlazan con el antígeno, con inclusión, por ejemplo, de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')₂, de un fragmento Fv, de un locus de enlace del anticuerpo monocatenario, de un sFv, (iii) anticuerpos biespecíficos y porciones de enlace los antígenos de los mismos, y (iv) anticuerpos multiespecíficos y porciones de enlace de los antígenos de los mismos.

Se entenderá que los términos “se enlaza de manera específica”, “enlaza de forma específica” y “de enlace específico”, tal como se utilizan aquí, quieren indicar que el anticuerpo tiene una afinidad de enlace para un antígeno particular de, al menos, aproximadamente 10^6 M^{-1} , de una manera preferente de, al menos, aproximadamente 10^7 M^{-1} , de una manera más preferente de, al menos, aproximadamente 10^8 M^{-1} y, en el caso más preferente, de, al menos, aproximadamente 10^{10} M^{-1} .

Se entenderá que los términos “regiones marco” y “FRs”, tal como son usados aquí, quieren indicar las regiones de una región variable de inmunoglobulina adyacente a las Regiones que Determinan la Complementariedad (Complementarity-Determining Regions CDRs). Las CDRs son las porciones de una región variable de inmunoglobulina, que interactúan fundamentalmente con un antígeno. Tal como se muestra en la figura 1, ambas regiones V_H y V_L contienen cuatro FRs y están localizadas dentro de las porciones recuadradas de las secuencias de aminoácidos.

De forma particular, con referencia a la secuencia de aminoácidos, que está mostrada en la figura 1A (SEQ ID NO: 1), las FRs de cadena ligera están definidas por las secuencias de aminoácidos desde Asp1 hasta Cys23 ($\text{huV}_L\text{FR1}$), desde His39 hasta His54 ($\text{huV}_L\text{FR2}$), desde Gly62 hasta Cys93 ($\text{huV}_L\text{FR3}$), y desde Phe104 hasta Lys113 ($\text{huV}_L\text{FR4}$). Con referencia a la secuencia de aminoácidos, que está mostrada en la figura 1B (SEQ ID NO: 2), las FRs de cadena pesada están definidas por las secuencias de aminoácidos desde Glu1 hasta Ser25 ($\text{huV}_H\text{FR1}$), desde Trp36 hasta Gly49 ($\text{huV}_H\text{FR2}$), desde Arg67 hasta Ser98 ($\text{huV}_H\text{FR3}$), y desde Trp103 hasta Ser113 ($\text{huV}_H\text{FR4}$).

30 *Secuencias de proteínas de la invención*

La presente invención caracteriza anticuerpos que se enlanzan, preferentemente de forma específica, con el glicoesfingolípido GD2 de la superficie de las células humanas y que tienen regiones modificadas, que se derivan del anticuerpo m14.18. Las secuencias de aminoácidos V_H o V_L (o ambas) están modificadas o humanizadas con objeto de reducir su inmunogenicidad cuando son administradas a un ser humano. De conformidad con la invención, el anticuerpo m14.18 puede ser humanizado, por ejemplo, por medio de la utilización de métodos de desinmunización en los que son eliminados los epitopos potenciales de las células T o son debilitados por medio de la introducción de mutaciones, que reduzcan el enlace de un epitopo peptídico con una molécula MHC clase II (véanse, por ejemplo, las publicaciones WO98/52976 y WO00/34317). De manera alternativa, los epitopos no humanos de las células T son mutados de manera que correspondan a los epitopos propios humanos, que están presentes en los anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la patente norteamericana U.S. No. 5,712,120). La presente invención proporciona anticuerpos del GD2 que tienen regiones V_L y V_H , que incluyen, al menos, una secuencia FR humanizada, con lo que se reduce la inmunogenicidad cuando son administrados a un ser humano.

45 I. *Regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera*

Tal como se ha mencionado precedentemente, el hu14.18 incluye regiones variables humanizadas, que se derivan del anticuerpo m14.18, que mantiene el enlace específico con el antígeno GD2 humano. En algunas realizaciones de la invención, la región V_L del anticuerpo hu14.18 incluye el siguiente polipéptido:

55 **D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-**
N-G-N-T-Y-L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-
D-R-F-S-G-S-G-T-D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-
T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-L-K (SEQ ID NO: 1).

60

En realizaciones particulares, el anticuerpo hu14.18 incluye una FR1 de cadena ligera, que está definida por los residuos 1 hasta 23 de la SEQ ID NO: 1, concretamente definida por D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C($\text{huV}_L\text{FR1}$).

ES 2 346 205 T3

En otras realizaciones de la invención, la región V_H del anticuerpo hu14.18 incluye el siguiente polipéptido:

E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-
N-M-N-W-V-R-O-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G-A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-

1

K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-
V-S-G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S (SEQ ID NO: 2).

1

En realizaciones particulares, el anticuerpo hu14.18 incluye una FR1 de cadena pesada, que está definida por los residuos 1 hasta 25 de la SEQ ID NO: 2, concretamente definida por E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S (huV_nFR1).

En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo hu14.18 incluye una FR3 de cadena pesada, que está representada por los residuos 67 hasta 98 de la SEQ ID NO: 2, concretamente definida por R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-F-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S (huV_uFR3).

De igual modo, quedan abarcadas en el ámbito de la presente invención diversas combinaciones de las realizaciones precedentes. Por ejemplo, el anticuerpo hu14.18 puede incluir la secuencia V_L indicada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia V_H indicada en la SEQ ID NO: 2. Las regiones V_L y V_H pueden estar enlazadas por medio de un enlace de disulfuro o por medio de un enlace peptídico, en función del modo en que estén construidas sus secuencias de ácidos nucleicos. En general, las regiones V están enlazadas por medio de un enlace de disulfuro cuando sus secuencias sean codificadas en constructos de ADN independientes. Por el contrario, las regiones V están enlazadas de forma típica por medio de un enlace peptídico cuando sus secuencias sean codificadas en un constructo de ADN monocatenario.

3

35 De la misma manera, la presente invención propone un anticuerpo, que se enlaza de forma específica con el GD2 y que incluye, al menos, una porción de las regiones V humanizadas. Por ejemplo, el anticuerpo hu14.18 puede incluir una región V_L , tal como se ha definido por medio de la SEQ ID NO:1 y una región V_H , que tenga, al menos, una FR humanizada, tal como la hu V_H FR o la hu V_H FR2. De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede incluir una región V_H , tal como se ha definido por medio de la SEQ ID NO: 2 y una región V_L , que tenga, al menos, una FR humanizada, tal como la hu V_L FR1. De la misma manera, el anticuerpo hu14.18 puede incluir una región V_H , que tenga, al menos, una FR humanizada y/o una región V_L , que tenga, al menos, una FR humanizada.

40 En ciertas realizaciones de la invención, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada pueden estar acopladas, respectivamente, con una región constante de cadena ligera y con una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina tienen regiones constantes, que se denominan cadenas kappa o cadenas lambda. En una realización particular de la invención, la región constante de cadena ligera es una cadena kappa. Las regiones constantes de cadena pesada, y diversas modificaciones y combinaciones de las mismas están tratadas en detalle a continuación

4

II. *Porción Ec*

Los dominios variables del anticuerpo de la presente invención están fusionados, de manera opcional, con una porción Fc. Tal como se utiliza aquí, la porción Fc comprende dominios, que se derivan de la región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina, de manera preferente de una inmunoglobulina humana, que incluye un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. La región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina está definida como un polipéptido, que se produce de forma natural o que se produce por vía sintética, homólogo con, al menos, una porción de una región C-terminal de la cadena pesada, que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2, CH3, y, para algunas clases de cadena pesada, los dominios CH4. La región "bisagra" une al dominio CH1 con la región CH2-CH3 de una porción Fc. La región constante de las cadenas pesadas de todas las inmunoglobulinas de mamíferos presenta una gran similitud en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de ADN para estas regiones de inmunoglobulina son perfectamente conocidas en el estado de la técnica. (Véase, por ejemplo, la publicación de los autores Gillies *et al.* (1989) *J. Immunol. Meth.* 125:191).

En la presente invención, la porción Fc incluye, de forma típica, al menos un dominio CH2. Por ejemplo, la porción Fc puede incluir toda la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1-bisagra-CH2-CH3). De manera alternativa, la porción Fc puede incluir la totalidad o una porción de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

65 La región constante de una inmunoglobulina es responsable de un gran número de importantes funciones efectoras de acción complementaria del humor y del suero. Es (E. R.) la acción del complemento. Existe una gran

principales de regiones constantes de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, y IgM, cada una de las cuales con funciones efectoras características designadas por isotipo.

Así por ejemplo, la IgG se subdivide en cuatro isotipos γ : $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$, que se conocen también como IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, respectivamente. Las moléculas IgG pueden interactuar con un gran número de clases de receptores celulares con inclusión de tres clases de receptores Fc γ (Fc γ R) específicos de la clase IgG del anticuerpo, concretamente Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII. Se ha descrito que las secuencias importantes para el enlace de IgG con los receptores Fc γ R se encuentran en los dominios CH2 y CH3.

La semivida en suero de un anticuerpo está influenciada por la capacidad que tiene de dicho anticuerpo para enlazarse con un receptor Fc (FcR). De manera similar, la semivida en suero de las proteínas de fusión de inmunoglobulina está igualmente influenciada por la capacidad que tienen para enlazarse con dichos receptores (Gillies *et al.*, Cáncer Research (1999) 59:2159-66). Los dominios CH2 y CH3 de la IgG2 y de la IgG4 tienen una afinidad de enlace indetectable o disminuida con los receptores Fc, en comparación con la afinidad de enlace de la IgG1. Por lo tanto, la semivida en suero del anticuerpo considerado puede ser aumentada por medio del uso del dominio CH2 y/o CH3 procedente de los isotipos IgG2 o IgG4. De manera alternativa, el anticuerpo puede incluir un dominio CH2 y/o CH3 procedente de la IgG1 o de la IgG3 con modificación en uno o varios aminoácidos en estos dominios, con objeto de reducir la afinidad de enlace con los receptores Fc (véase, por ejemplo, la solicitud de patente norteamericana U.S. 09/256,156, publicada como publicación de solicitud de patente U.S. 2003-0105294-A1).

Normalmente, la región bisagra de la porción Fc es adyacente al extremo C del dominio CH1 de la región constante de cadena pesada. Cuando se encuentra incluida en las proteínas de la presente invención, la bisagra es homóloga de una región de inmunoglobulina de origen natural y, de forma típica, incluye residuos de cisteína, que enlazan dos cadenas pesadas por medio de enlaces de disulfuro, como ocurre en las inmunoglobulinas naturales. Secuencias representativas de regiones bisagra para inmunoglobulina humana y de ratón, pueden encontrarse en la publicación INGENIERÍA DE ANTICUERPOS una GUÍA PRÁCTICA -ANTIBODY ENGINEERING, a PRACTICAL GUIDE-, (Borrebaeck, ed., W. H. Freeman and Co., 1992).

Las regiones bisagra adecuadas para la presente invención pueden derivarse de las IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y de otros isotipos de inmunoglobulina. El isotipo IgG1 tiene dos enlaces de disulfuro en la región bisagra, que permiten la formación eficiente y consistente del enlace de disulfuro. Por lo tanto, una región bisagra preferente de la presente invención se deriva de la IgG1. De manera opcional, la primera cisteína, en la mayoría de los casos N-terminal, de una bisagra IgG1 está mutada con objeto de reforzar la expresión y el ensamblaje de anticuerpos o de proteínas de fusión de anticuerpos de la invención (véase, por ejemplo, la solicitud de patente norteamericana U.S. 10/093,958, publicada como publicación de solicitud de patente U.S. 2003-0044423-A1).

En contra de lo que ocurre en el caso de la IgG1, se sabe que la región bisagra de la IgG4 forma de manera ineficiente enlaces de disulfuro intercatenarios (Angal *et al.*, (1993), Mol. Immunol. 30:105-8). De la misma manera, la región bisagra de la IgG2 tiene cuatro enlaces de disulfuro que tienden a favorecer la oligomerización y, posiblemente, el enlace de disulfuro incorrecto durante la secreción en sistemas recombinantes. Una región bisagra adecuada para la presente invención puede derivarse de la región bisagra de la IgG4, que contiene, de manera preferente, una mutación que refuerza la formación correcta de los enlaces de disulfuro entre las mitades derivadas de cadena pesada (Angal *et al.*, (1993), Mol. Immunol. 30(1):105-8). Otra región bisagra preferente se deriva de una bisagra de la IgG2, en la que las dos primeras cisteínas están respectivamente mutadas en otro aminoácido, tal como, en orden de preferencia general, serina, alanina, treonina, prolina, ácido glutámico, glutamina, lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, glicina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptofano o selenocisteína (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0044423-A1).

Una porción Fc fusionada con una región variable del anticuerpo de la invención puede contener los dominios CH2 y/o CH3 y una región bisagra, que se derivan de diversos isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la porción Fc puede contener los dominios CH2 y/o CH3 de la IgG2 o de la IgG4 y una región bisagra de la IgG1. El ensamblaje de tales porciones Fc híbridas ha sido descrito en la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0044423-A1.

Cuando se fusiona con una región variable del anticuerpo de la invención, la porción Fc contiene, de manera preferente, una o varias modificaciones de aminoácidos, que aumentan, por regla general, la semivida en suero de una proteína de fusión Fc. Tales modificaciones de aminoácidos incluyen mutaciones que substancialmente disminuyen o eliminan el enlace con el receptor Fc o la actividad de fijación del complemento. Por ejemplo, un tipo de dicha mutación elimina el locus de glicosilación de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En la IgG1, el locus de glicosilación es Asn297 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente norteamericana U.S. 10/310,719, publicada como publicación de solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166163-A1).

III. Región de acoplamiento por fusión

Las regiones variables del anticuerpo de la presente invención pueden ser opcionalmente enlazadas o fusionadas con una mitad no inmunoglobulina de forma directa o indirecta, tal como a través de un péptido enlazante (por ejemplo (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 3)). La inmunogenicidad de las proteínas de fusión descritas puede ser reducida si se

menoscaba la capacidad del acoplamiento por fusión o del epitopo de acoplamiento para interactuar con el receptor de las células T, tal como se ha descrito en la publicación de solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166877-A1. Precisamente en una fusión entre dos proteínas humanas, por ejemplo la Fc humana y la IL-2 humana, la región que rodea al acoplamiento por fusión o al epitopo de acoplamiento incluye una secuencia peptídica que normalmente no está presente en el cuerpo humano y que, por consiguiente, puede ser inmunogénica. La inmunogenicidad del epitopo de acoplamiento puede ser reducida, por ejemplo, por medio de la introducción de uno o varios locus de glicosilación cerca del acoplamiento por fusión, o por medio de la identificación de un epitopo candidato de las células T que puentee al acoplamiento tal como se ha descrito en la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166877-A1 y que cambie un aminoácido cerca del acoplamiento con objeto de reducir la capacidad que tiene el epitopo candidato de las células T para interactuar con un receptor de las células T.

Por lo tanto, la semivida en suero de la proteína puede ser acrecentada por medio de la introducción de mutaciones en la región de acoplamiento por fusión. Por ejemplo, en una proteína que incluya un dominio CH3 fusionado con una mitad no inmunoglobulina, la lisina C-terminal del dominio CH3 puede ser cambiada por otro aminoácido, tal como por alanina, que puede proporcionar un aumento substancial de la semivida en suero de la proteína de fusión resultante.

En ciertas realizaciones, es deseable una escisión proteolítica del acoplamiento por fusión. Por lo tanto, la región intergénica puede incluir una secuencia de nucleótido que codifique un locus de escisión proteolítica. Este locus, que está interpuesto entre la inmunoglobulina y la citocina, puede estar diseñado para que proporcione el desprendimiento proteolítico de la citocina en el locus diana. Por ejemplo, se sabe perfectamente que la plasmina y la tripsina se escinden después de los residuos de lisina y de arginina en los loci que son accesibles a las proteasas. Se conocen perfectamente otras endoproteasas específicas del locus y las secuencias de aminoácidos que son reconocidas por las mismas.

25

IV. Tratamiento de enfermedades humanas con las proteínas de fusión de anticuerpo hu14.18

Las regiones variables del anticuerpo de la invención están enlazadas con una citocina. De manera preferente, la proteína de fusión de anticuerpo y de citocina o el inmunoconjungado presenta actividad biológica de citocina. En la realización preferente, el dominio variable del anticuerpo está fusionado con la IL-2. De manera preferente, varios aminoácidos están mutados dentro de la mitad IL-2 con objeto de reducir la toxicidad, como se ha descrito en la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166163-A1.

Por ejemplo, las figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de una realización particular de una proteína de fusión del anticuerpo de conformidad con la invención. De manera específica, la figura 3A muestra la secuencia peptídica de una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, que incluye una región variable y una región constante. La figura 3B muestra la secuencia peptídica de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada enlazada con la IL-2. Los polipéptidos proporcionan una proteína de fusión de anticuerpo humanizado, capaz de enlazarse de manera específica con el GD2 y de estimular al sistema inmune.

De manera opcional, los complejos proteicos pueden incluir, así mismo, un segundo agente, tal como una segunda citocina. En una realización, una proteína de fusión de anticuerpo hu14.18 incluye la IL-12 y la IL-2. La construcción de los complejos proteicos, que contienen un dominio de inmunoglobulina y dos citocinas diferentes, está descrita en detalle en la patente norteamericana U.S. No. 6,617,135.

Las proteínas de fusión de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de enfermedades en los seres humanos, tal como el cáncer. Cuando se tratan tumores humanos, es particularmente adecuado administrar una proteína de fusión de anticuerpo y de IL-2, que comprenda las regiones V de la invención, por medio de una infusión o por medio de una inyección subcutánea, empleándose dosis comprendidas entre 0,1 y 100 miligramos/metro²/paciente. En una realización preferente, es particularmente adecuado administrar una proteína de fusión de anticuerpo y de IL-2, que comprenda las regiones V de la invención, por medio de infusión o de inyección subcutánea, empleándose dosis comprendidas entre 1 y 10 miligramos/metro²/paciente y, de una manera más preferente, comprendida entre aproximadamente 3 y 6 miligramos/metro²/paciente.

55

Se ha puesto de manifiesto por medio de estudios clínicos que, después de la administración de la hu14.18-IL-2, la proteína de fusión conserva su capacidad para llevar a cabo la activación de las células sensibles a la IL-2 por medio del receptor de la IL-2 y que conserva su capacidad para enlazarse con las células tumorales positivas al GD2 y para suministrar la IL-2 en su superficie. Por otra parte, la administración de la proteína de fusión hu14.18-IL-2 a un paciente canceroso da como resultado la estabilización de la progresión de la enfermedad en un número sorprendentemente amplio de pacientes (véase el ejemplo 1).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser empleadas en formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones o similares, de manera preferente en formas de dosificación unitaria, adecuadas para llevar a cabo la administración de dosis precisas. Las composiciones incluyen un vehículo o excipiente farmacéuticamente convencional, de manera adicional pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, soportes, adyuvantes, etc. Tales excipientes pueden incluir otras proteínas, tales como, por ejemplo, albúmina de suero humano o proteínas de plasma. Los métodos actuales para

llover a cabo la preparación de tales formas de dosificación son conocidos o son aparentes para los técnicos en la materia. La composición o la formulación, que debe ser administrada, deberán contener, en cualquier caso, una cantidad de uno o de varios componentes activos en una cantidad efectiva con objeto de conseguir el efecto deseado en el sujeto sometido al tratamiento.

5 La administración de las composiciones correspondientes puede efectuarse por vía de cualquier modo aceptado para llevar a cabo la administración de agentes que muestren dicha actividad. Estos métodos incluyen la administración oral, parenteral o tópica y formas sistémicas de otro tipo. La inyección intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable es un método preferido para llevar a cabo la administración (véase el ejemplo 1).

10 La cantidad del compuesto activo administrada dependerá, naturalmente, del sujeto que sometido al tratamiento, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, y de la opinión del médico que lleva a cabo la prescripción.

15 *Ácidos nucleicos de la invención*

I. *Constructos de anticuerpo hu14.18*

20 La invención se refiere, así mismo, a ácidos nucleicos capaces de expresar cada uno de los tipos de proteínas precedentes. Estos incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2; una región V_L de anticuerpo hu14.18, que incluye la secuencia de aminoácidos hu V_L FR1; una región V_H de anticuerpo hu14.18, que incluye la secuencia de aminoácidos hu V_H FR1; una región V_H de anticuerpo hu14.18, que incluye la secuencia de aminoácidos hu V_H FR3; y 25 proteínas de fusión, que comprenden un anticuerpo hu14.18, que incluye, al menos, una de las secuencias FR humanizadas precedentes y uno o varios agentes terapéuticos.

30 Los anticuerpos hu14.18 de esta invención pueden ser producidos por medio de técnicas de ingeniería genética; por ejemplo por medio de la formación de un constructo de ácido nucleico, que codifique un anticuerpo específico del GD2, que contenga las FRs deseadas de la presente invención. En una realización, el constructo génico, que codifica el anticuerpo considerado, incluye un segmento de ADN, en el sentido 5' hacia 3', que codifica una región variable de cadena pesada, que incluye en la misma, al menos, una FR humanizada y un segmento de ADN, que codifica una región constante de cadena pesada. En otra realización, otro segmento de ADN, que codifica una citosina, está fusionado con el extremo 3' del segmento de ADN, que codifica la región constante de cadena pesada. En una realización diferente, el constructo génico incluye, en el sentido 5' hacia 3', un segmento de ADN, que codifica una región variable de cadena pesada, que incluye, al menos, una FR humanizada y un segmento de ADN, que codifica una citosina. De manera alternativa, un ácido nucleico de la invención puede incluir, en el sentido 5' hacia 3', un segmento de ADN, que codifica una región variable de cadena ligera, que incluye en la misma, al menos, una FR humanizada y un segmento de ADN, que codifica una citosina. En algunas realizaciones, un ácido nucleico, que codifica una citosina, está ensamblado en el marco del extremo 3' de un gen, que codifica una región constante (por ejemplo, exon 40 CH3), bien directamente o bien a través de una región intergénica (por ejemplo por medio de segmentos enlazadores apropiados, tales como por ejemplo el ADN, que codifica (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 3)).

45 II. *Expresión de constructos de anticuerpo hu 14.18*

50 El ácido nucleico, que codifica las proteínas de la presente invención, puede ser ensamblado con, o puede ser insertado en, uno o en varios vectores de expresión para llevar a cabo la introducción en una célula receptora adecuada, en la que es expresado. La introducción de ácidos nucleicos en vectores de expresión puede ser llevada a cabo según técnicas estándar de la biología molecular. Los vectores de expresión preferidos incluyen aquellos, a partir de los cuales, puede ser expresada la proteína codificada bien en bacterias o bien en células de mamíferos.

55 De conformidad con la invención, una cadena pesada de una región variable de anticuerpo es preferentemente coexpresada en la misma célula con una cadena ligera correspondiente. Para las proteínas de fusión, que comprendan múltiples cadenas polipeptídicas, puede ser empleado más de un vector de expresión. Los métodos de cotransfección que utilizan, por ejemplo, dos vectores de expresión, frecuentemente dan como resultado el que ambos vectores sean suministrados a una célula diana. De manera alternativa, a veces es conveniente emplear un vector único, que codifique una pluralidad de polipéptidos para la coexpresión en la misma célula.

60 De forma ejemplificativa, las figuras 2A-D muestran la secuencia de ácidos nucleicos de un vector único, que codifica tanto la cadena pesada así como la cadena ligera de una inmunoglobulina de conformidad con la invención. Por lo tanto, el vector incluye un ácido nucleico, que codifica la IL-2 fusionada con el extremo 3' de la cadena pesada de inmunoglobulina. De este modo, cuando se introduce en una célula, este vector puede proporcionar, por si solo, una proteína de fusión de anticuerpo humanizado y de IL-2, que se enlaza de manera específica con el GD2 y que estimula la inmunofunción.

65 Por otra parte, puede ser conveniente llevar a cabo la expresión de las proteínas de la presente invención en forma de moléculas monocatenarias. De manera ejemplificativa, una región variable de anticuerpo puede ser expresada como un

ES 2 346 205 T3

anticuerpo monocatenario o sFv opcionalmente fusionado con una proteína no inmunoglobulina. En otra realización, una cadena pesada (con o sin una citocina fusionada) está combinada con un complemento de cadena ligera (o pesada) (con o sin citocina fusionada) para formar inmunoconjungados monovalentes y divalentes.

- 5 Las líneas de células receptores son, de manera preferente, células linfoides, tales como un mieloma (o hibridoma). Los mielomas pueden sintetizar, ensamblar y secretar inmunoglobulinas codificadas por genes transfectados y pueden llevar a cabo la glicosilación de proteínas. Una célula receptora particularmente preferente es el mieloma Sp2/0, que normalmente no produce inmunoglobulina endógena. Cuando es transfectada, la célula produce únicamente inmunoglobulinas codificadas por los constructos génicos transfectados. Los mielomas transfectados pueden hacerse crecer en cultivos o en el peritoneo de ratones, del que pueden ser recuperados los inmunoconjungados secretados a partir del fluido ascítico. De la misma manera, pueden ser empleadas como células receptoras otras células linfoides tales como los linfocitos B.
- 10

- 15 Existen diversos métodos para llevar a cabo la transfección de las células linfoides con vectores, que contengan constructos de ácido nucleico, que codifiquen la cadena Ig quimérica. Una vía preferente para llevar a cabo la introducción de un vector en las células linfoides consiste en la fusión de esferoblastos (véase por ejemplo la publicación de los autores Gillies *et al.* (1989) *Biotechnol.* 7:798-804). Métodos alternativos incluyen la electroporación o la precipitación con fosfato de calcio. Otros métodos adecuados para llevar a cabo la producción de los inmunoconjungados incluyen la preparación de una secuencia de ARN, que codifique el constructo y su traducción en un sistema apropiado *in vivo* o *in vitro*. Una vez expresadas, las proteínas de la invención pueden ser recogidas por medio de procedimientos estándar para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, la patente norteamericana U.S. No. 5,650,150).
- 20

III. Tratamiento de cáncer por medio de terapia génica

- 25 Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser empleados como agentes de terapia génica para llevar a cabo el tratamiento de cáncer o de otras enfermedades en las que sea deseable dirigir al sistema inmune hacia un tipo celular específico. Por ejemplo, pueden ser eliminadas células a partir de un ser humano o de un animal, y pueden ser transfectados en las células uno o varios ácidos nucleicos, que codifican un anticuerpo de la presente invención. Las células son reintroducidas a continuación en el ser humano o en el animal. Las células transfectadas pueden ser células normales o células cancerosas. De manera alternativa, puede ser introducido *in situ* un ácido nucleico en células. Entonces el ser humano o el animal produce una respuesta inmune a las células cancerosas, que puede curar o reducir la gravedad del cáncer. Una región variable del anticuerpo de la invención, acoplada con elementos reguladores apropiados para fomentar la expresión en células de mamíferos, puede ser transfectada en las células por cualquiera de las diversas técnicas, que incluyen la vía del fosfato de calcio, un cañón génico "gene gun", vectores de adenovirus, liposomas catiónicos, vectores retrovirales, o cualquier otro método de transfección eficiente.

- 40 En una realización particular de la invención, un anticuerpo hu 14.18 es empleado para suministrar de forma selectiva una citocina a una célula diana *in vivo* de tal forma que la citocina pueda ejercer un efecto biológico localizado tal como una respuesta inflamatoria localizada, una estimulación del crecimiento y de la activación de las células T, o una actividad ADCC. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo es administrada en el sistema circulatorio de un sujeto que alberga la célula diana.

- 45 La invención está ilustrada con mayor detalle por medio de los ejemplos no limitativos.

Ejemplos

- 50 Ejemplo 1

Purificación y formulación de la hu14.18-IL2

- 55 Se llevó a cabo, en un estudio, la expresión de la hu14.18-IL2 a partir de células NS/0, se recogió el sobrenadante de cultivo tisular, y la proteína hul 4.18-IL2 se purificó por medio del empleo, en el orden indicado, de cromatografía en columna con resina Abx Mixed, cromatografía con proteína A recombinante, y cromatografía en columna de Q Sepharose, seguido por una diafiltración con flujo tangencial Pellicon 2 para cambiar el tampón por el tampón de la formulación. Los detalles de estas etapas de esta purificación están descritos más adelante. La inactivación de los virus y las etapas de eliminación fueron interdigitalizadas en estas etapas como se ha descrito más adelante. La inactivación de los virus y las etapas de eliminación no eran necesarias para llevar a cabo la purificación *per se*, pero se utilizaron para satisfacer consideraciones reglamentarias.

- 60 Se ajustó a 5,9 el pH de dos litros de sobrenadante de cultivo tisular NS/0, en los que estaba contenida la hu14.18-IL2, con ácido acético 1M y se cargaron en una columna Abx (J. T. Baker); se lavaron con MES 10 mM, acetato de sodio 100 mM a pH 6,2; y se eluyeron con acetato de sodio 500 mM a pH 7. Este material se cargó en una columna de proteína A recombinante (Pharmacia); se lavó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 7; se lavó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 6; se lavó con fosfato de sodio 10 mM a pH 7; y se eluyó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 3,5. El pH del material eluido era de 4,2. Para fomentar la inactivación de los

virus, este pH se redujo a 3,8 y la preparación se incubó durante 30 minutos, después de lo cual se neutralizó el pH a 7 con NaOH 1M. Para retirar el ácido nucleico, este material se cargó en una columna de Q sepharose (Pharmacia) y se lavó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 7. El ácido nucleico se enlazó con la columna, mientras que la proteína fue encontrada en la corriente de salida y en los lavados, que se repitieron hasta que el A280 retornó a la línea de referencia. Se llevó a cabo una diafiltración Pellicon 2 (Millipore) de conformidad con las instrucciones del fabricante de tal manera, que el material final, constituido por la hu14.18-IL2, fue colocado en la siguiente formulación.

10	1. Manitol	4 %
15	2. Hidrocloruro de arginina USP/NF	100 mM
20	3. Ácido cítrico USP-FCC	5 Mm
	4. Polisorbato 80	0,01 % (p.v)

El pH del tampón de la formulación se ajustó a 7 con NaOH 1 M.

A modo de etapa final, la preparación fue filtrada a través de una membrana Viresolve 180 (Millipore), que tenía un peso molecular redondeado hacia abajo de 180.000 Dalton. Esto tenía el efecto de "rectificación" del material de tal manera, que fueron eliminados, como resultado, los dímeros agregados y los oligómeros de orden superior.

Ejemplo 2

Actividad antitumoral de la proteína de fusión hu14.18-IL-2

Observada en los ensayos clínicos en fase I

Para llevar a cabo la evaluación de la seguridad y de la eficacia del hu14.18-IL-2, se llevó a cabo un ensayo clínico en fase I. Los pacientes elegibles tenían melanoma histológicamente confirmado, que estaba considerado como incurable desde el punto de vista quirúrgico y médico. Estos pacientes podían tener o bien enfermedades medibles o evaluables desde el punto de vista metastásico o bien podían no tener evidencia de enfermedad como consecuencia de la resección quirúrgica bien de metástasis distante o bien de enfermedad regionalmente recurrente. Los pacientes con recurrencias locales o regionales múltiples (dos o más) fueron incluidos únicamente si habían tenido previamente evidencia de implicación de nódulo linfático y si cada recurrencia estuvo espaciada en el tiempo por, al menos, 2 meses. Todos los pacientes debían tener una función adecuada de la médula ósea (definida por el número total en leucocitos (WBC) > 3.500/ml, o por el total de granulocitos > 2.000/ml, de plaquetas > 100.000/ml, y de hemoglobina > 10,0 g/dl), una función hepática adecuada [definida por una aspartatoaminotransferasa (AST) < 3 x normal y un total en bilirrubina < 2,0 mg/dl], y una función renal adecuada (definida por creatinina en suero < 2,0 mg/dl o un aclaramiento de la creatinina > 60 ml/minuto). Todos los pacientes tenían un estado general según la electrocorticografía (ECOG) de 0 o de 1 y tenían una esperanza de vida 12 semanas como mínimo. Se excluyeron aquellos pacientes que habían recibido previamente quimioterapia, terapia por radiación, u otra terapia inmunosupresora dentro de las 4 semanas previas al estudio. Los pacientes podían haber tenido previamente metástasis en el sistema nervioso central (CNS) si habían sido tratadas y eran estables durante, al menos, 4 semanas antes del inicio del estudio. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes.

Este ensayo en fase I se diseñó como un estudio de ensayo abierto con escalación de la dosis no aleatoria, en el que grupos de 3 hasta 6 pacientes recibieron la hu14.18-IL-2 en uno de los niveles de dosificación siguientes: 0,8, 1,6, 3,2, 4,8, 6,0 o 7,5 mg/m²/día. La hu14.18-IL-2 fue administrada en una base hospitalaria en forma de una infusión intravenosa (IV) durante 4 horas (IV), a lo largo de 3 días consecutivos durante la primera semana de cada sesión. La proteína de fusión hu14.18-IL-2 fue administrada a los pacientes en una formulación, que comprendía un 4% de manitol; arginina HCl, 100 mM; citrato, 5 mM; y un 0,01% de Tween 80, a pH 7. Los pacientes fueron dados de alta del hospital, si se encontraban estables, aproximadamente 24 horas después de haberse completado la tercera infusión. Los episodios adversos y las toxicidades fueron clasificados de conformidad con los criterios de toxicidad común -NCI Common Toxicity Criteria- (versión 2.0) y de conformidad con la escala de clasificación de la toxicidad del centro integral del cáncer de la universidad de Wisconsin -University of Wisconsin Comprehensive Cáncer Center Toxicity Grading Scale- para la IL-2 (estado general, ganancia de peso, y temperatura). La toxicidad limitadora de la dosis (DLT) se definió como la aparición de toxicidad de grado 3 o 4 distinta de linfopenia, de hiperbilirubinemia, de hipofosfatemia o de hiperglicemia, de grado 3. La dosis máxima tolerada (MTD) se definió como el nivel de dosificación con el que dos de seis pacientes tuvieron DLT durante la primera sesión. Pacientes con toxicidades relacionadas con el tratamiento de grado 3 fueron requeridos para recuperar, al menos, el grado 1 antes de

ES 2 346 205 T3

que pudiesen reanudar el tratamiento con una reducción de la dosis del 50% para la segunda sesión. Los pacientes con una progresión de la enfermedad $\geq 25\%$ fueron retirados del estudio. Los pacientes con enfermedad estable recibieron la administración en la segunda sesión.

5 Se evaluaron en los pacientes las propiedades farmacocinéticas del hu14.18-IL-2. Cuando los niveles en hu14.18-IL-2 fueron evaluados en series de muestras procedentes del conjunto de los 33 pacientes inmediatamente después de la primera infusión durante 4 horas (primer día, primera sesión), se encontró que la semivida era de 3,7 horas (+/- desviación estándar SD de 0,9 h). Esta es intermedia entre las semividas de sus 2 componentes (aproximadamente 45 minutos para la IL-2 y de 3 días para el anticuerpo químérico m14.18), y es comparable con lo que se observó con respecto a la semivida de la m14.18-IL-2 químérica en ratones. Como consecuencia del aclaramiento de la hu14.18-IL-2 a partir del suero de estos pacientes, no pudieron ser detectados los componentes correspondientes a la IL-2 ni al anticuerpo hu14.18. La cresta en suero y el área situada por debajo de la curva (AUC) durante la primera sesión mostró un aumento significativamente dependiente de la dosis ($p < 0,001$).

10 15 En este estudio fueron tratados treinta y tres pacientes en este estudio. La tabla 1 enumera los resultados clínicos. Únicamente dos pacientes (6%) completaron los 2 primeros días de los 3 días de la primera sesión. Uno de estos pacientes (nivel de dosis 3) tenía un grado 3 de hiperbilirrubinemia al segundo día del tratamiento, y el otro paciente (nivel de dosis 6) tenía un grado 3 de hipoxia y de hipotensión, que requirió tratamiento para llevar a cabo su contención. Dos de estos pacientes tuvieron progresión de la enfermedad y no recibieron una segunda sesión de terapia. Diecinueve pacientes (58%) tenían enfermedad estable después de la primera sesión de terapia y recibieron una segunda sesión de terapia. Cinco pacientes (15% de todos los pacientes) requirieron una reducción de la dosis al 50% para la segunda sesión como consecuencia de eventos adversos en la primera sesión. Diecisiete pacientes (52% de todos los pacientes) completaron la segunda sesión. Un paciente (nivel de dosis 4) declinó recibir la infusión final durante la segunda sesión y un paciente (nivel de dosis 6) interrumpió la infusión final durante la segunda sesión debido a una hipotensión. 20 25 30 Ocho pacientes (24% de todos los pacientes) tenían enfermedad estable después de la segunda sesión de tratamiento. Los resultados indican que la hu14.18-IL-2 ha provocado la estabilización de la progresión de la enfermedad en un número sorprendentemente elevado de pacientes.

Ocho de los 33 pacientes mantuvieron la enfermedad estable después de 2 sesiones de terapia, y 4 de estos 8 pacientes siguieron sin tener evidencia de la progresión de la enfermedad (1 con enfermedad estable y 3 con ausencia de evidencia de enfermedad) durante 20-52 meses desde que se completó el protocolo de terapia.

35 Cinco de los 33 pacientes iniciaron el estudio con enfermedad no mensurable como consecuencia de una resección quirúrgica de recurrencias o de metástasis. Dos de estos cinco pacientes tuvieron progresión de la enfermedad, mientras que los 3 pacientes restantes continuaron sin tener evidencia de la enfermedad (20-52 meses). Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que el beneficio clínico procedente de una intervención inmunoterapéutica es más probable en un paciente con una baja carga tumoral. Un paciente adicional tuvo un descenso objetivo en un nódulo pulmonar después de dos sesiones de terapia, pero la respuesta global de la enfermedad fue puntuada como progresión de la enfermedad debido al crecimiento en un nódulo distante. El nódulo fue extirpado después de la terapia con la hu14.18-IL-2 y el paciente permaneció libre de progresión de la enfermedad durante más de 3 años. 40

TABLA 1

45	Resultados clínicos	
50		Número de pacientes
	Pacientes que completan la primera sesión	31
55	Enfermedad estable después de la primera sesión	19
	Reducción del 50 % de la dosis para la segunda sesión	5
60	Pacientes que completan la segunda sesión	17
	Enfermedad estable después de la segunda sesión	8

65 Inmunoestimulación *in vivo* por medio de la hu14.18-IL-2 en un ensayo clínico en fase I.

De la misma manera, los pacientes tratados con la hu14.18-IL-2 fueron examinados con respecto a las indicaciones de inmunoestimulación. A los 2-4 días se produjo una linfopenia de sangre periférica, y esto fue seguido por un rebrote de linfocitosis los días 5-22. Estos dos cambios eran dependientes de la dosis ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Los recuentos de linfocitos en los días 5, 8, 15 y 22 fueron significativamente mayores que la línea de referencia de la primera sesión. El recuento de linfocitos de la línea de referencia para la segunda sesión (día 29 de la primera sesión) creció por encima del recuento de linfocitos de la línea de referencia para la primera sesión, lo que indica que efectos de la primera sesión de tratamiento están presentes todavía en el día 29. De manera adicional, los recuentos de linfocitos durante la segunda sesión en los días 5, 8 y 15 son mayores que los valores correspondientes para los días 5, 8 y 15 durante la primera sesión para estos 12 pacientes.

El fenotipo de la superficie celular de los linfocitos mostró una expansión de CD16+ y de linfocitos CD56+ (marcadores de células asesinas naturales (NK)) después de la primera semana de terapia con la hu14.18-IL-2. Este efecto estaba presente todavía el día 29 de la primera sesión (día 1, segunda sesión). Se determinó en los días 15 y 22 el fenotipo de la superficie celular de los linfocitos para los pacientes 19-33 (que recibieron 4,8-7,5 mg/m²/día), además de hacerse en los días 1 y 8. Este análisis demostró que el aumento de CD56 y de las células de coexpresión CD56/CD16 permaneció significativamente elevado ($p < 0,01$) los días 8, 15 y 22.

A título de una medida de la inmunoactivación, se obtuvieron niveles de la proteína C-reactiva (CRP) para los pacientes 13-33 y niveles del receptor de la IL-2 soluble (sIL-2R) para los 31 pacientes que completaron la primera sesión. Tanto en la primera sesión así como en la segunda sesión estaba presente un aumento significativo en promedio de la CRP en el tratamiento los días 3-5 en comparación con la línea de referencia para cada sesión. Este aumento de la CRP retornó a los niveles de la línea de referencia al 8º día de cada sesión de tratamiento. El nivel del sIL-2R se encontraba significativamente acrecentado por encima de la línea de referencia comenzándose a las 24 horas después de la infusión de la hu14.18-IL-2 tanto durante la primera sesión así como durante la segunda sesión, que persistió hasta el 8º día. Se encontró que el aumento del sIL-2R dependía de la dosis ($p = 0,014$), los valores del sIL-2R de la segunda sesión estaban acrecentados en comparación con los valores correspondientes en la primera sesión en los días 1-5 para pacientes que recibieron la misma dosis en ambas sesiones ($p < 0,05$).

Para llevar a cabo la evaluación de la función NK activada con la IL-2 y de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedente de 31 pacientes, que completaron la primera sesión, se empleó la línea celular de neuroblastoma LA-N-5, que expresa al GD2 y que se enlaza con la hu14.18-IL-2. Se presentó un aumento significativo en la destrucción inducida por los linfocitos a partir del 8º día, en comparación con el 1er día para estos dos ensayos. Los 12 pacientes que recibieron la segunda sesión con la misma dosis que en la primera sesión, mostraron resultados de ADCC, que eran muy similares a los que se obtuvieron durante la primera sesión. El único parámetro, que se encontró diferente para la segunda sesión con respecto a la primera sesión, fue la destrucción acrecentada en presencia de la IL-2 el 1er día, lo que indica que la destrucción aumentada en este ensayo permanece elevada en el 29º día (1er día, segunda sesión).

Puesto que la diana LA-N-5 es relativamente resistente a las células NK frescas, ésta es adecuada para llevar a cabo la medición de la destrucción aumentada por la IL-2, y la ADCC. Sin embargo, la débil destrucción de la LA-N-5 inducida con ayuda de la PBMC fresca en medio (sin suplemento de IL-2 *in vitro*) no era al 8º día significativamente mayor que la del 1er día.

Se llevaron a cabo ensayos NK estándar para los pacientes 19-33 los días 1, 8, 15 y 22, empleándose la línea celular diana K562 susceptible a la NK. Se observó un aumento significativo en la lisis por NK de las células diana K562, cuando fueron ensayadas bien en medio o bien en presencia de la IL-2, en los días 8º y 22º, en comparación con el 1er día. De la misma manera, se llevaron a cabo evaluaciones de muestras de suero procedentes de pacientes seleccionados con objeto de determinar la actividad de la IL-2 funcional y el anticuerpo anti-GD2 funcional.

La línea celular Tf-1b sensible a la IL-2 demostró una proliferación inducida por la IL-2 con suero de pacientes obtenido después de la infusión de la hu14.18-IL-2. Se observó un aumento progresivo de la proliferación durante las primeras 4 horas después de la infusión durante 4 horas. Los valores volvieron a la línea de referencia al cabo de 16 horas después de esta infusión, lo que es consistente con la semivida en suero para la hu14.18-IL-2 de aproximadamente 4 horas. De la misma manera, se examinaron muestras de suero procedentes de estos períodos de tiempo por medio de citometría de flujo con respecto a la presencia de la inmunocitocina hu14.18-IL-2 (IC) intacta, que conserva su componente IL-2 y su actividad anticuerpo anti-GD2. La hu14.18-IL-2 capaz de enlazarse con la línea celular M21 (positiva al GD2) era detectable en muestras de suero de pacientes después de una infusión de IC. La cantidad de IC capaz de enlazarse con la M21 aumentó progresivamente durante las primeras 4 horas después de la infusión durante 4 horas y disminuyó después de esto, nuevamente de forma consistente con la semivida de aproximadamente 4 horas.

Por último, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con muestras procedentes de pacientes, con objeto de determinar si la administración de la hu14.18-IL-2 daba como resultado condiciones *in vivo* consistentes con las que son necesarias para alcanzar la ADCC. Las PBMCs procedentes del 8º día mostraron un aumento de la ADCC sobre células diana GD2+ cuando se añadió la hu14.18-IL-2 al ensayo citotóxico. Se llevó a cabo este mismo ensayo de ADCC con la PBMC procedente del 8º día, sin embargo, en lugar de añadirse la hu14.18-IL-2 al ensayo, se añadió suero procedente del paciente, obtenido antes o después de la administración de la hu14.18-IL-2. Las PBMC obtenidas a partir de pacientes en el 8º día de la segunda sesión eran capaces de favorecer la destrucción acrecentada de la línea celular

ES 2 346 205 T3

LA-N-5 en presencia de suero obtenido después de la administración de la hu14.18-IL-2, en comparación con lo que se observa con el suero obtenido antes de la infusión. De este modo, la hu14.18-IL-2, que circula en los pacientes, después de la administración IV, es capaz de facilitar la ADCC con las PBMCs activadas *in vivo* por medio de la hu14.18-IL-2, procedente del mismo paciente.

5 En resumen, estos resultados indican que existían cambios inmunológicos asociados con esta terapia por medio de la hu14.18-IL-2 con inclusión de un aumento en el recuento de linfocitos, de un aumento en el porcentaje de CD16+ y de CD56+ PBMC, de un aumento en la lisis de NK y de un aumento en la ADCC. Una prueba adicional de la inmunoactivación incluía un aumento en niveles en suero de la CRP y del sIL-2R. Análisis de laboratorio de
10 suero y de PBMC mostraron que la molécula de hu14.18-IL-2, que circula en el suero del paciente después de la administración IV conservaba su capacidad para activar a las células sensibles a la IL-2 por medio del receptor de la IL-2 y que conservaban su capacidad para enlazarse con las células tumorales positivas al GD2, y para suministrar la
15 IL-2 en su superficie, como se ha detectado por medio de citometría de flujo. Las células NK fueron activadas *in vivo* en base a su capacidad para favorecer la función NK y ADCC *in vitro*. Por otra parte, las células NK activadas *in vivo* por medio de la hu14.18-IL-2 administrada a estos pacientes, eran capaces de inducir la ADCC facilitada por medio de la hu14.18-IL-2, que circula en el suero de estos mismos pacientes. Por lo tanto, se alcanzaron condiciones para lograr una inmunoactivación en todos los pacientes en este estudio.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión de anticuerpo humanizado y de IL-2, designada como hu14.18-IL2, que se enlaza de manera específica con el GD2 y que estimula una inmunofunción, que comprende la cadena ligera de la SEQ ID No. 5 y la cadena pesada de la SEQ ID No. 6.
- 10 2. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 4, que contiene las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de fusión de la reivindicación 1.
- 15 3. Composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente farmacéutico.
4. Uso de la proteína de fusión de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento destinado a la estabilización de la progresión de enfermedades en pacientes con cáncer positivo al GD2.
5. Uso de la proteína de fusión de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento destinado a acrecentar la actividad ADCC y la lisis de NK en pacientes con cáncer positivo al GD2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada

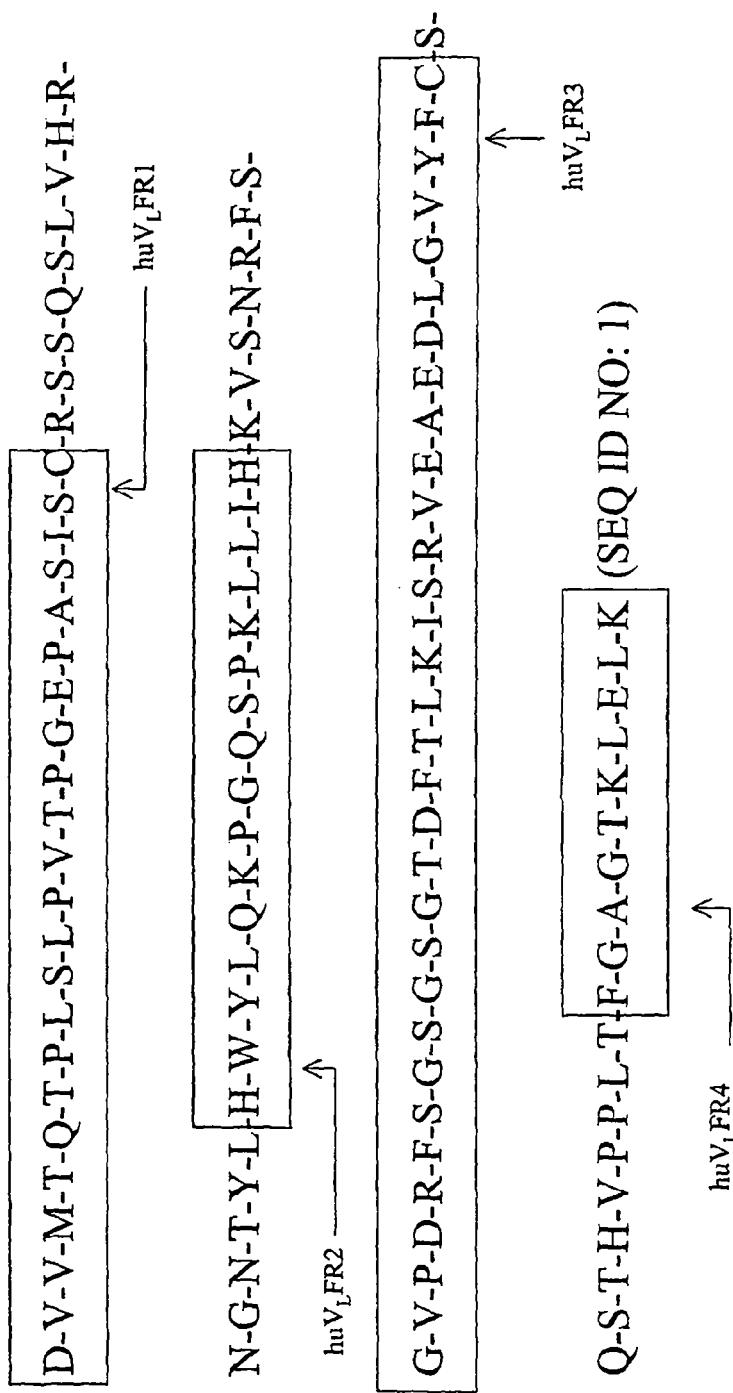


FIG. 1A

Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada

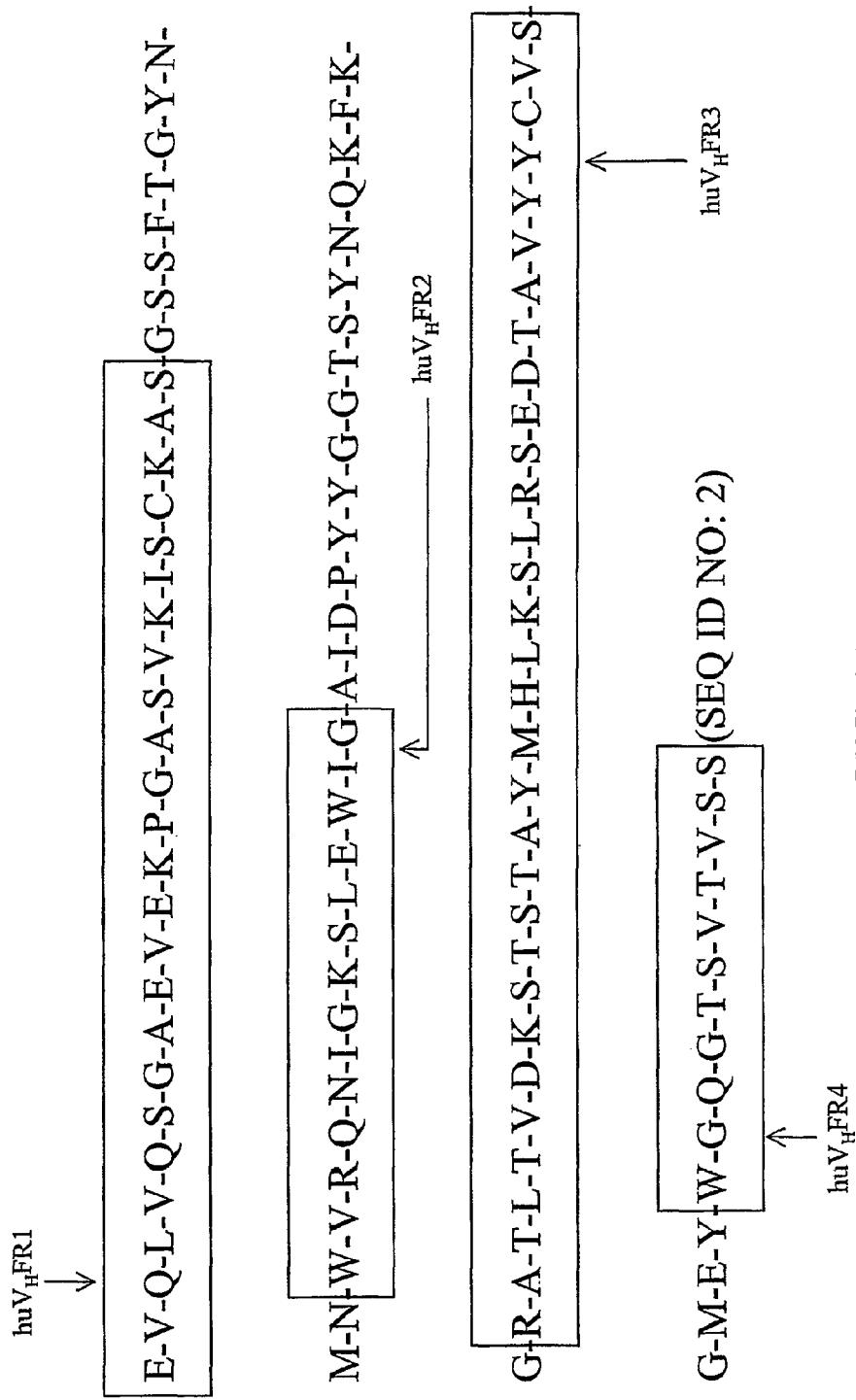


FIG. 1B

Secuencia de nucleótidos del vector de expresión

GTCGACATTGATTATTGACTAGITATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCCAT
 ATATGGAGTTCCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC
 GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
 AATGGGTGGAGTATTACCGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
 CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT
 GGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCCGTTTG
 GCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGATTTCAGTCTCCACCCATTGA
 CGTCAATGGGAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGC
 CCCATTGACGCAAATGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTGGC
 TAATACAGAACCCACTGTTAATGGCTTATCGAAATTAAATACGACTCACTATAGGGAGACCTC
 TAGAATGAAGTGCCTGTTAGGCTTGGTGTATGTTCTGGATTCCCTGGTGGAGGAGAGGGAA
 GTGAGGGAGGAGAATGACAGGGAGCAGGAGCACTGAATCCATTGCTATTCCATGTATCTGGC
 ATGGGTGAGAAGATGGGTCTTATCTCCAGCATGGGCCTCTGGGTGAATACTTGTAGAGGGA
 GGTCTCAGATGGGAACATGTGCTATAATGAAGATTATGAAATGGATGCCCTGGATGGCTAAAGTA
 ATGCCCTAGAAGTGAATGACTAGAACACTGCAATTCACTTTTGGTAAGAAGAGATTAGGCTATA
 AAAAAATGTTATGAAAAAAACGATCACAGTGAATGGAAATGGGAGGATGGCTATGTCAG
 AATTGTTGTTAATGTTCTCTCATTTGTTAGCTTCAAGCTGGGAGGCTCCAGACAGGTTCA
 AAGCTCTGATTCAAAAGTTCCAACCGATTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGG
 TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTATTCTGT
 TCTCAAAGTACACATGTTCCCTCGTCACGTTGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTATT
 AGTGTGTCAGGGTTTACAAGAGGGACTAAAGACATGTCAGCTATGTTGACTAATGGTAATGTC
 ACTAAGCTGGGGATCCCGCAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACGTGGCATTCTGCCT
 AAAGCATTGAGTTACTGCAAGGTCAGAAAGCATGCAAGGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCT
 CCAACAAAACAAATTAGAAACTTAAAGGAATAGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAACATCA
 AGATTTAAATACGCTTCTGGCTCTCTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTCTGCT
 GTCTCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAACACACACCCAGGGCAGAACACTTGTGTTACTAAAC
 ACCATCCTGTTGCTTCTCTCAGGAACATGTTGCTGACCATCTGCTTCTCATCTCCGCCATCTG
 ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTGTTGCTGCTGCTGAATAACCTATCCCAGAGG
 CCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCAATGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAG
 CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
 AGAAAACACAAAGTCTACGCCCTGCAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTACAAGAGC
 TTCAACAGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGGCCCCACCTGCTCTCAGTTCCAGCCTGACCCCC
 TCCCATCCTTGGCCTCTGACCCCTTCCACAGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCAT
 CTTCACCTCACCCCCCTCCTCTCTGGCTTTAAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAAAT
 AAAGTGAATCTTGCACCTGTGGITCTCTCTCTCAATTAAATTATTATCTGTTGTTACCA
 ACTACTCAATTCTCTTATAAGGGACTAAATATGTTAGTCATCCTAACGGCGATAACCATTATAAA
 AATCATCCTTCATTCTTACCCATCATCCTCTGCAAGACAGCTCCTCTGCTAAACCCACAAGCC
 TTCTGCTCCTCACAGTCCCCCTGGCCATGGTAGGAGAGACTGCTTCTCTGTTCTCCCTCCTCAGCA
 AGCCCTCATAGTCTTTAAAGGGTAGGCTTACGGTCTATATCCTTGATTCAATTCCCTGG
 GAATCAACCAAGGCAAATTCAAAAGAAGAAACCTGCTATAAAAGAGAATCATTGCAACA
 TGATATAAAATAACAACACAATAAAAGCAATTAAATAACAAACATAGGGAAATGTTAAGTTC
 ATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATGCCATTTCACATTAAACAGGTAATGAGGGAC
 TCCCTGCTGCCAAGGGCGTATTGAGTACTTCCACACCTAAATTAATCCACACTATAACTGTTGAG
 ATTAAAAACATTCAATTAAATGTTGCAAAGGGTCTATAAAAGCTGAGGAGACAAATATTTATAAC
 TCAGCAATCCCACTCTAGGGTCGATCGACGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAGTAATC
 AATTACGGGTCAATTAGTTCATAGGCCATATATGGAGTTCCCGCTTACATAACTACGGTAAATGG
 CCCGCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
 AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGC
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC

FIG. 2A

ES 2 346 205 T3

CTGGCATTATGCCCAAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCATGGTATCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCA
CGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGG
GACTTCCAAAATGTCGAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGTAGGCGTGTACGGTG
GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTGGCTAATCAGAAACCCACTGCTTAACGGCTATCGAAA
TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTCCTCGAGGCTAGAATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG
TTGGTCTGATGTTCTGGATTCTGGTAGGGAGAGAGGGAAAGTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGA
GCAGGAGCACTGAATCCCATGCTCATCCATGTATCTGCATGGGTAGAGAAGATGGCTTATCC
TCCAGCATGGGGCCTCTGGGTGAATACITGTTAGGGAGGTTCCAGATGGAACATGTGCTAT
AATGAAGATTGAAATGGATGCCTGGATGGCTAAGTAATGCCCTAGAAGTGAAGTACTAGACACTT
GCAATTCACTTTTTGGTAAGAAGAGATTITAGGCTATAAAAAAAATGTTATGAAAAAAACG
ATCACAGTTGAAAATTTGGGAAAGATGTTCATGAATTITGTTATGAAACTATGTTTCT
CTCTCATGTTTCACTCCCTAAGCGAGGTGCACTGGTCACTGGCGCCAGGGCTACAAACATGAAC
CCGGCGCCTCCGTGAAGATCTCTGCAAGGCCCTCCGGCTCCTCCITACCCGGCTACAAACATGAAC
GGGTGCGCCAGAACATGGCAAGTCCCTGGAGTGGATCGGCCCATCGACCCCTACTACGGCGC
ACCTCTACAACCAAGAAGTCAAGGGCGCGCCACCCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGC
CTACATGCACCTGAAGTCCCTGCGCTCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGTGTCCGGCATGGA
GTACTGGGCCAGGGCACCTCCGTGACCGTGTCCCTCCGGTAAGCTTCTGGGCCAGGCCAGGCT
GACCTGGCTTGGGCAGGGAGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCAGCCAGGTGCACACCC
AATGCCCATGAGGCCAGACACTGGACCGTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGCCTCTG
CGCCCTGGGCCAGCTCTGCCCCACCCGGCTCACATGGCACCCCTCTTGTGACGCCCTACCA
AGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGGACCTCTGGGCCAGCGGGCCCTGG
GCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGTTAGACTCAGGCCCTGACCA
GCGCGTGCACACCTTCCCGCTGCTCACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCGCGTGGTA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGGCCAGAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGGAAAGCC
AGGCTAGCGCTCTGCTGGACGCATCCCGCTATGCACTCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGG
CCCCGCTGCCTCTCACCCGGAGGCCCTGCCCCCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTG
GCTTTTCCCCAGGCTCTGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCCTAACCCAGGCCCTGACACAAAGG
GGCAGGTGCTGGCTCAGACCTGCAAGGCCATATCCGGAGGCCCTGCCCCCTGACCTAACCC
CACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTGGACACCTCTCTCTCCAGATTCAGTAA
CTCCCAATCTCTCTGCGAGGCCAAATCTGTGACAAAACACTCACACATGCCAACCGTCCCCAG
GTAAGCCAGCCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATC
CAGGGACAGGCCAGGCCGGTGCTGACACGCCACCTCCATCTCTCTCAGCACCTGAACCTC
GGGGGGACCGTCAGTCTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCC
TGAGGTACATGCGTGGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAAGTGA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGTGGACC
CGTGGGGTGCAGGGCCACATGGACAGAGGCCCTGGCCACCCCTGCCCCCTGAGAGGTGACCG
CTGACCAACCTCTGCTCCCTACAGGGCAGCCCGAGAACCCACAGGTGACACCCCTGCCCATCAC
GGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTGCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACACTACAAGAACCCAGGCCCTGGTGT
GGACTCCGACGGCTCTCTCTATGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAG
GGAACGTCTCTCATGCTCGTGTGCAAGGGCTGACAAACCAACTACACGCGAGAACGCCCT
CCCTGCTCCGGTAAAGCCCAACTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTGCAACTGGAGCAT
CTCTGCTGGATCTCCAGATGTTCTGAATGCCAATTAACAACACTACAAGAACCTCCAGTGT
ATGCTCACATTCAAGTTCTACATGCCAAGAAGGCCACAGAGCAGTCAAACATCTCCAGTGT
GAGGAAGTCAAAACCTCTGGAGGAAGTGTCAAACCTCGCTCAGAGCAAAACTCCACTTAAGACC
TAGGGACTTAATCAGCAATACACGTAAAGTCTGGAACTAAAGGGATCGAAACACATTCA
TGTGTAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGAGAATTCTGAACAGATGGATTACCTTGT

FIG. 2B

ES 2 346 205 T3

AAAGCATCATCTAACACTAACCTGATAATTAGTCCTGAGGGATCCAGACATGATAAGATACA
TTGATGAGTTGGACAAACCACAACTAGAATGCACTGAAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAAATTGCAATT
ATGCTATTGCTTATTGTAACCATTAGAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAAATTGCAATT
ATTTATGTTTCAGGGGAGGTGAGGTTAAAGCAAGTAAACACCTCTACAAAT
GTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCCTCGCGTTCGGTATGACGGTAAAACCTGACACAT
GCAGCTCCGGAGACGGTCACAGCTGCTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGACAAGCCGTCAGG
GCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAAGCATAGCGGA
GTGTATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCCGTG
AAATACCGACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGGCTTCTCCGCTCTCGCTACTG
ACTCGCTGGCTCGCTGGCTTCCGCTCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGGTAATACCGT
TATCCACAGAATCAGGGATAACGCAAGGAAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAGGCCGCGTGTGGCTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAGAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGGTITCCCC
CTGGAAAGCTCCCTCGCTCCGTITCCGACCCCTGCCCTACCGGATAACCTGTCGCCCTTCT
CCCTCGGAAGCGTGGCGTTCTCAATGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTT
CGCTCCAAGCTGGCTGTGACGAACCCCCCGTTCAGCCGACCGCTGCCCTATCGGTAAAC
TATCGTCTTGAGTCCAACCGGTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGG
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAAGCGGTGCTACAGAGTTCTGAGTGGTGGCTAACTACGGCTA
CACTAGAAGGACAGTTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAGAGTTGG
TAGCTCTGATCCGCAACAAACACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTGTGTTGCAAGCAGCAGAT
TACCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGTATCTTACGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTGGTCTGAGGATTATCAAAGGATCTTACCTAGATCCT
TTAAATTAAAAAGTAAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACCTGGTCTGACAGTTA
CCAATGCTTAACTAGTGAGGCACCTATCTAGCGATCTGCTTACCGTCTGACAGTTA
CTCCCCGTGCTGAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA
CCCGAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGGGAAAGGCCGA
GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCCCTCATCCAGTCTATTAAATTGTCGCCGAAGCTAG
AGTAAGTAGTCGCACTGTTGGTATGGCTTACCGTCTGCACTGCTGAGGATCTGGTGTGTC
ACGCTCGTGTGGTATGGCTTACCGTCTGCTCCGATCGTGTGAGAAGTACATGATC
CCCCATGTTGTCAAAAAGCGGTTAGCTCCCTCGGTCTCGATCGTGTGAGAAGTAAAGTGGC
CGCAGTGTATCCTCATGGTTAGGCAGCAGTGCATAATCTCTACTGCTATGCCATCGTAAGA
TGCTTTCTGTGACTGGTAGACTCAACCAAGTCATCTGAGAAATAGTGTATGCCGACCGAGT
TGCTCTGCCCCGGCTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAACTTAAAGTGTCTCATC
ATTGGAAAACGTTCTGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTAGATCGGCTGAGCAG
TAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTCAGCATTTACTTCACCGCGTTCTGGGTGAGCAG
AAACAGGAAGGCAAAATGCCCAAAAGGGATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAACTCAT
ACTCTTCCCTTTCAATATTATTGAGCATTATCAGGGTATTGCTCTCATGAGCGGATACATATT
GAATGTATTAGAAAATAAACAAATAGGGGTCGGCGCACATTCCCGAAAAGTGCCACCTGA
CGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAATAGGCATACGAGGCCCTTCG
TCTTCAAGAATTCCGATCCAGACATGATAAGATACATTGAGTTGGACAAACCACAACTAGA
ATGCACTGAAAAAAATGCTTATTGTAAGGTTGATGCTATTGCTTATTGTAACCAATTAGAA
GCTGCAATAACAAAGTTAACACAAACAAATTGCACTCATTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGT
GGGAGGTGTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTTGAGGTTATGCTGATGATCTAAAGCCAG
CAAAGTCCCAGGGCTTAAAGGTTACAGCTTCCGAGGGGAGCAGAGAAGTGAACGATGAAAGC
TTCCTGTTAGTCTTCTCTCGTAGACCTTAAACTCATACTGTTGATCTTCTCTCTGACCTCAG
AGAGGACGCCGGGATTCTGGAGGAGGTTATATTCTCCCAATCAATTCTGGGAAACAGTGT
CACTTCAAAATTCTGCTCATGATCTTGTACAAAGAGTCTGAGGTGGCTGTTGATTCTGGCTTC
CTGGTAAACAGAAGTGCCTCCGACTATCCAAACCATGTCATTTACTGCAATTCCGGTTGTTCA
ATAAGCTTAAAGGATCATCCAAACTTTGGCAAGAAAATGAGCTCTCGTGGGTTCTTGAGT
TCTCTACTGAGAAGTATATTAAATTCTGCTTAAAGGTCATTCTCTCAGGAATGGAGAACAG

FIG. 2C

GTTCCTACCCATAATCACCAAGATTCTGTTACCTCCACTGAAGAGGTTGTGGTCATTCTTGGA
AGTACTTGAACCTCGTTCCTGAGCGGAGGCCAGGGTCGGTCTCGTCTGCCAATCCCCATATTTG
GGACACGGCGACGATGCAGTTCAATGGTCAACCAGGGCACCAAGCTAGCTTTGCAAAAG
CCTAGGCCTCCAAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCC
TCTGCATAAAATAAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAAATGGCGGAAGTGGCGGAGTTAG
GGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGCA
TACTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGACTTCCACACCTGGTGTGACTAATTGAGATGCATGCA
TTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTCCACACCTAACTGACACACATTCCACA
(SEQ ID NO: 4)

FIG. 2D

Cadena ligera de immunoglobulina humanizada

D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-N-G-N-T-Y-
L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-T-
D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-
L-K-R-T-V-A-A-P-S-V-F-I-F-P-P-S-D-E-Q-L-K-S-G-T-A-S-V-V-C-L-L-N-N-F-Y-P-R-
E-A-K-V-Q-W-K-V-D-N-A-L-Q-S-G-N-S-Q-E-S-V-T-E-Q-D-S-K-D-S-T-Y-S-L-S-S-T-

L-T-L-S-K-A-D-Y-E-K-H-K-V-Y-A-C-E-V-T-H-Q-G-L-S-S-P-V-T-K-S-F-N-R-G-E-C
(SEQ ID NO: 5)

FIG. 3A

Cadena pesada de inmunoglobulina humanizada-IL-2

E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-J-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-N-M-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-I-E-W-I-G-
 A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S-
 G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S-A-S-T-K-G-P-S-V-F-P-L-A-P-S-S-K-S-T-S-G-G-T-A-A-L-G-C-L-V-K-D-Y-F-P-
 E-P-V-T-V-S-W-N-S-G-A-L-T-S-G-V-H-T-F-P-A-V-L-Q-S-S-G-L-Y-S-L-S-S-V-V-T-V-P-S-S-S-L-G-T-Q-T-Y-I-C-N-
 V-N-H-K-P-S-N-T-K-V-D-K-R-V-E-P-K-S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V-F-L-F-P-P-K-P-K-D-T-L-
 M-I-S-R-T-P-E-V-T-C-V-V-V-D-V-S-H-E-D-P-E-V-K-F-N-W-Y-V-D-G-V-E-V-H-N-A-K-T-K-P-R-E-E-Q-Y-N-S-T-Y-
 R-V-V-S-V-L-T-V-L-H-Q-D-W-L-N-G-K-E-Y-K-C-K-V-S-N-K-A-L-P-A-P-I-E-K-T-I-S-K-A-K-G-Q-P-R-E-P-Q-V-Y-
 T-L-P-P-S-R-E-E-M-T-K-N-Q-V-S-L-T-C-L-V-K-G-F-Y-P-S-D-I-A-V-E-W-E-S-N-G-Q-P-E-N-N-Y-K-T-T-P-P-V-L-D-
 S-D-G-S-F-F-L-Y-S-K-L-T-V-D-K-S-R-W-Q-Q-G-N-V-F-S-C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q-K-S-L-S-L-S-P-G-A-P-
 T-S-S-T-K-K-T-Q-L-E-H-L-L-D-L-Q-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-R-M-L-T-F-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-
 E-L-K-H-L-Q-C-L-E-E-E-L-K-P-L-E-E-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-L-R-P-R-D-L-I-S-N-I-N-V-I-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-
 F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-C-Q-S-I-I-S-T-L-T (SEQ ID NO: 6)

FIG. 3B

ES 2 346 205 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Gillies, Stephen D.
Lo, Kin-Ming

5 <120> Secuencias de inmunocitocinas y usos de las mismas

<130> LEX-023

<150> US 60/433,945

10 <151> 2002-12-17

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

15 <211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada

<400> 1

25

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

30 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

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

40 Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

50 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

55 Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

60 Lys

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada

ES 2 346 205 T3

<400> 2

5	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Glu	Lys	Pro	Gly	Ala
	1					5					10				15	
10	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
					20				25				30			
15	Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Asn	Ile	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
					35				40				45			
20	Gly	Ala	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
					50			55				60				
25	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
					65			70				75			80	
30	Met	His	Leu	Lys	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95		
35	Val	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser
					100				105				110			

Ser

35

<210> 3

40

<212> PRT

<220>

45 <223>

<400> 3

50

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

55

<210> 4

<211> 10531

<212> DNA

60

<220>

223

Vector que contiene la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humanizada y IL-2

65

ES 2 346 205 T3

<400> 4

5 gtcgacattg atta~~t~~gact agttat~~ta~~at agtaatcaat tacggggta ~~t~~tagttcata
60
10 gcccata~~t~~at g~~g~~agttccgc gttacataac t~~t~~acggtaaa tggccgcct ggctgaccgc
120
15 ccaacgaccc c~~u~~gcccattg acgtcaataa t~~g~~acgtatgt tcccata~~g~~ta acgccaatag
180
20 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcag~~t~~ac
240
25 atcaagtgta t~~c~~at~~a~~tgcc~~a~~ agtacgccc~~t~~attgacgt caatgac~~g~~gt aaatggcccg
300
30 cctggcatta tgccc~~g~~at~~t~~ac atgac~~c~~ttat gggactttcc tacttggcag tacat~~t~~acg
360
35 tattagtcat cgctattacc atgg~~t~~gat~~g~~c ggtttggca gtacatcaat gggcgtggat
420
40 agcggttga ctcacggggta tttccaagtc tccacccat t~~g~~acgtcaat gggagt~~t~~gt
480
45 tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccg~~c~~ ccattgacgc
540
50 aaatggcgg taggcgtgta cgg~~t~~ggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta
600
55 cagaacccac tgcttaactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagaccctc
65

ES 2 346 205 T3

660

5 tagaatgaag ttgcctgtta ggctgttgt gctgatgttc tggattcctg gtgaggagag
720

10 agggaaagtga gggaggagaa tggacaggga gcaggagcac tgaatccat tgctcattcc
780

15 atgtatctgg catgggtgag aagatggtc ttatcctcca gcatggggcc tctgggtga
840

20 atacttgtta gagggagggtt ccagatggga acatgtgcta taatgaagat tatgaaatgg
900

25 atgcctggga tggtctaagt aatgccttag aagtgactag acacttgcaa ttcaactttt
960

30 ttggtaagaa gagatttttta ggctataaaa aaatgttatg taaaaataaaa cgatcacagt
1020

35 taaaaataaaa aaaaatata aggatgttca tgaattttct gtataactat gtatttctat
1080

40 ctcattgttt cagtttcctt aagcgacgtg gtgatgaccc agaccccccgt gtccctgccc
1140

45 gtgaccccccgt gcgagcccgcc ctccatctcc tgcagatcta gtcagagtct tgtacaccgt
1200

50 aatggaaaca cctatttaca ttggcacctg cagaagccag gccagtctcc aaagctcctg
1260

55 attcacaaag tttccaaaccg attttctggg gtcccgacaca ggttcagtggtt cagtgatca
1320

60 gggacagatt tcacactcaa gatcagcaga gtggaggctg aggatctggg agtttatttc
1380

65 ttttctcaaa gtacacatgt tcctccgctc acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg
1440

70 aaacgttatta gtgtgtcagg gtttcacaag agggactaaa gacatgtcag ctatgtgtga
1500

75 ctaatggtaa tgcactaag ctgcgggatc ccgcaattct aaactctgag ggggtcggat
1560

80 gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa
1620

85 gcccctcagaa tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaacattt taaggaatag
1680

55

60

65

ES 2 346 205 T3

ggggaa~~g~~cta ggaagaaaact caaaacatca agat~~tt~~taaa tacgcttc~~ct~~ ggtctc~~tt~~tg
1740

5 ctataa~~tt~~at ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta
1800

tccgcaaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgg~~tt~~gc~~tt~~tc
1860

10 tttcc~~cc~~cagg aactgt~~gg~~ct gcaccatctg tcttc~~at~~ctt cccg~~cc~~atct gatgagcagt
1920

15 tgaaat~~tt~~gg aactgc~~cc~~ct gt~~tg~~gt~~tg~~cc ~~tg~~ctgaataa ct~~tc~~atccc agagagg~~cc~~a
1980

20 aagtacagtg gaagg~~tt~~ggat aacgc~~cc~~ctcc aatcg~~gg~~taa ctcccaggag agt~~gt~~tc~~ac~~ag
2040

25 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgc~~tg~~ agcaaagcag
2100

30 actac~~cc~~gagaa acacaaagtc tacg~~cc~~tg~~cg~~ aagt~~ca~~ccca tcagggc~~ct~~g agctcgcccc
2160

35 tcacaaagag ct~~tc~~caacagg ggagagt~~gt~~tt agagggagaa gtgc~~cc~~ccac ctg~~tc~~c~~tc~~ca
2220

40 gttcc~~cc~~gc~~ct~~ gaccc~~cc~~ctcc catc~~tt~~gg cctctgaccc tt~~tt~~ccaca gggac~~cc~~ac
2280

45 ccctat~~tt~~gc~~gt~~ gtc~~ct~~cc~~ag~~c tc~~at~~tt~~tc~~ca cctcac~~cc~~cc ctc~~tc~~c~~tc~~cc tgg~~tt~~taa
2340

50 ttat~~gc~~aat gttgg~~aa~~gg aatguataaa ~~aa~~agt~~ga~~at ctttgcac~~ct~~ gtgg~~tt~~tc
2400

tctttc~~tc~~ca at~~ta~~at~~ta~~at tattat~~ct~~gt tg~~tt~~ac~~ca~~ a~~ca~~st~~ca~~att tct~~tt~~ataa
2460

55 gggactaaat at~~gt~~at~~gt~~cat cctaaggcgc ataaccattt ataaaaatca tc~~cc~~tc~~at~~tc
2520

60 tattttaccc tatcat~~tc~~tc tgcaagacag tc~~ct~~cc~~tc~~ca aacc~~cc~~cacaag c~~tt~~ct~~gt~~cc
2580

65 tcacag~~tc~~cc ctgg~~cc~~at~~g~~ gtaggagaga ct~~tg~~at~~tc~~ct tg~~tt~~cc~~cc~~ tc~~tc~~c~~ag~~caa
2640

70 gccc~~tc~~at~~ag~~ tc~~ct~~tt~~ta~~aa cgg~~tg~~ac~~ag~~gg tct~~tc~~cg~~gt~~tc atat~~at~~c~~tt~~ tgatt~~ca~~att
2700

55

60

65

ES 2 346 205 T3

ccctggaaat caaccaaggc aaattttca aaagaagaaa cctgctataa agagaatcat
2760

5 tcattgcaac atgatataaa ataacaacac aataaaagca attaaataaa caaacaatag
2820

ggaaatgttt aagttcatca tggtaatgg acttaatgg atgtcatgcc ttatccat
2880

10 tttaaaccat gtactgaggg actcctgtct gccaagggcc gtattgagta ctttccacaa
2940

cctaatttaa tccacacat actgtgagat taaaacatt cattaaaatg ttgcaaaacgt
3000

15 tctataaagc tqagagacaa atatattcta taactcagca atccsactic taggqtcqat
3060

20 cgacgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacgg gtcattagtt
3120

catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga
3180

25 ccgcggcaacg acccccggcc attgazgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca
3240

30 atagggactt cccattgacc tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc ccacttggca
3300

35 gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccttattt acgtcaatga cgctaaatgg
3360

cccgcctggc attatgcccc gtacatgacc tttatggact ttcttacttgc gcaglacatc
3420

40 tacgtatttag tcatcgctat taccatggtg atgcgggtttt ggcagttacat caatgggagt
3480

45 ggatagcggt ttgactcaag gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt
3540

ttgtttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattt
3600

acgcaaatgg gcggtggcg tgtacgggtgg gaggtctata taagcagagc tctctgctca
3660

50 actacagaac ccactgctta actggcttat cgaaatata acgactcaat atagggagac
3720

ccaagctccct cgaggctaga atgaagttgc ctgttaggt gttgggtgctg atgttctgga

55

60

65

ES 2 346 205 T3

3780

ttcctgtga ggagagaggg aagtgagggg ggagaatgga cagggagcag gacactgaa
3840

5 tcccatgct cattccatgt atctggcatg ggtgagaaga tgggtttat cctccagcat
3900

10 gggccctctg gggtaatac ttgttagagg gaggttccag atggaaacat gtgtataat
3960

qaagatcatg aatggatgc ctggatggt cttaatgt ctttaatagt gactagacac
4020

15 ttgcattca tttttttgg taagaagaga tttaggct aaaaaaaat gttatgtaaa
4080

aataaacat cacagttgaa aaaaaaaaaa aataaaggaa tgttcatgaa ttttgttat
4140

20 aactatgtat ttctctctca ttgtttcagc ttcccttaagc gaggtgcagc tggcagtc
4200

25 cggcgccgag gtggagaagc cggcgcctc cgtgaagatc ttttgcagg cttccggctc
4260

ctccttccacc ggttacaaca tgaactgggt gcgccagaac atcgcaagt ccctggatg
4320

30 gatcgccgccc atcgaccctt actacggcgg caccccttac aaccagaatg tcaagggccs
4380

cgccacccctg accgtggaca agtccaccc tcaccccttac atgcacatgt agtccctgcg
4440

35 ctcggaggac accgcccgtgt actactgcgt gtccggcatg gagttactggg gccagggcac
4500

40 ctcctgtgacc gtgtcctccg gtaagctttt ctggggcagg ccaggctgtt cttggcttt
4560

45 gggggcaggaa gggggcttaag gtgaggcagg tggtgcagc caggtgcaca cccatgc
4620

50 aatgagcccaag acactggacg ctgaacctcg cggacatgtt agaaccacgg ggcctctgcg
4680

ccctggggccc agctctgtcc cacaccgcgg tcacatggca ccacccctct tgcagccctcc
4740

55 accaaggggcc catcggtttt cccctggca ccctccccc agagcacctc tgggggcaca
4800

55

60

65

ES 2 346 205 T3

gccccctgg gctgcctgg: caaggactac ttccccgaac cggtaacggt gtcgtggaac
4860

5 tcaggcqccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccggctg tcctacagtc ctcaggactc
4920

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tggcaccca gaccacatc
4980

10 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttgg tgagaggcca
5040

15 gcacagggag ggagggtgtc tgctggaagc caggtcagc gtcctgcct ggacgcattc
5100

cggctatgca gtcaggatcc agggtagcaa ggcaggcccc gtcgcctct tcacccggag
5150

20 gctctgccc gccccactca tgctcaggaa gagggttttc tggcttttc cccaggctt
5220

ggcaggcac aggctaggtg cccctaaccg aggccctgca cacaagggg caggcgtgg
5280

25 gctcagacct gccaagagcc atatccgggaa ggaccctgca cctgacctaa gcccacccca
5340

30 aaggccaaac tctccactcc ctcagctcgg acaccccttc tcctccaga ttccagtaac
5400

tcccaatctt ctctctgcag agccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccacccgt
5460

35 cccaggtaag ccagccagg cctgccttc cagctcaagg cggacaggt gcccatagt
5520

40 agcctgcata caggacagg cccagccgg gtgctgacac gtcacccctcc atctcttct
5580

cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctttt cccccaaaa cccaaggaca
5640

45 ccctcatgat ctccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag
5700

50 accctgaggt caagttcaac tggtaacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa
5760

55 agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc
5820

60

65

ES 2 346 205 T3

accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaqgt ctccaacaaa gccctcccag
5880

5 ccccratcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggtgggac ccgtggggcg cgagggccac
5940

10 atggacagag gccggctcg cccaccctct gccctgagag tgaccgctgt accaaccctct
6000

15 gtcctacag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc acgggaggag
6060

20 atgaccaaga accaggtcag cctgacccgc ctggtaaaag gtttatacc cagcgacatc
6120

25 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccg
6180

30 ctgyactccg acggctcctt ctcccttat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
6240

35 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
6300

40 cagaagagcc tctccctgtc cccggtaaa gccccactt caagttctac aaagaaaaca
6360

45 cagctgcaac tggagcatct cctgctggat ctccagatga ttctgaatgg aattaacaac
6420

50 tacaagaatc ccaaaactcac caggatgctc acattcaagt tctacatgcc caagaaggcc
6480

55 acagagctca aacatctcca gtgtcttagag gaggaactca aacctctgga ggaagtggata
6540

60 aacccctcgctc agagcaaaaaa cttccactta aqaccttaggg accttaatcag caataatcaac
6600

65 gtaatagttc tggaaactaaa gggatccgaa acaacattca tgtgtgaata tgctgtatgag
6660

70 acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga tggattacct ttgtcaaag catcatctca
6720

75 acactaactt gataattaag tgctcgaggg atccagacat gataagatac attgtatgagt
6780

80 ttggacaaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgttt tatttgtgaa atttgtatg
6840

85 ctattgtttt atttgtaacc attagaagct gcaataaaaca agtttacaac aacaatttgc
6880

90

95

ES 2 346 205 T3

6900
ttcattttat gtttcaggtt cagggggagc tgtggaggt ttttaaagc aagtaaaacc
6960
5 tctacaaatg tggtatggct gattatgatc ctgcctcgcg ctttcggtg atyacggtg
7020
10 aacacctctga cacatgcagc tcccgagac ggtcacagct tgtctgttaag cggatgcgg
7080
gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttgc ggggtgtcggg gcgcagccat
7140
15 gaccaggatca cgtacgcata gcggagtgtt tactggctt actatgcggc atcagagcag
7200
20 atlglactga gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc aragatgcgt aaggagaaaa
7260
taccgcata ggcgccttc cgttcctcg ctcactgact cgtgcgcgc ggtcggtcgg
7320
25 ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac gtttatccac agaatcaggg
7380
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag
7440
30 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga
7500
cgtcaagtc agaggcggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct
7560
35 ggaagctccc cgtgcgcgc tcctgttccg accctgcccgc ttaccqgata cctgtccgcc
7620
40 ttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct caatgctcac gctgttaggtt tctcagttcg
7680
gttaggtcg ttccgtccaa gctggctgt gtgcacgaac ccccccgttca gcccgaccgc
7740
45 tccgcattat ccggtaacta tcgtcttgcg tccaaacccgg taagacacga cttatgcaca
7800
ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag
7860
50 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatgttgg tatctgcgt
7920
55
60
65

ES 2 346 205 T3

ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaga gttggtagct ttgtatccgg caaacaacc
7980

5 accqctggta gcgggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaaggaa
8040

tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtggaa cgaaaactca
8100

10 cgttaaggaa ttgggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat cccttaaat
8160

15 taaaaatgaa gttttaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac
8220

20 caatgttaa tcagtggagc acctatctca gcgtatgtc tatttcgttc atccatagtt
8280

25 gcttgactcc ccgtcgtgt aataactacg atacgggagg gcttaccatc tggcczcaag
8340

30 gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca cggctccag atttacgtc aataaaccag
8400

35 ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtc
8460

40 attaattgtt gcccggaaagc tagagtaagt agttcgccag traatagttt ggcacacgtt
8520

45 gttggccattt ctgcaggcat cgtgtgtca cgctcgtcgt ttggatggc ttcatccag
8580

50 tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgcattccccaa tggtgtgcaa aaaaggggtt
8640

55 agcgccttcg gtcctccgtat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcaactatg
8700

60 gttatggcag cactgcataa ttctcttact gttatgccat ccgtaaatgc cttttctgtg
8760

65 actggtgagt acacaaccaa gtcattctga gaatagtgtt tgccggcggacc gagttgtct
8820

70 tgcccgccgt caacacggga taataccggc ccacatagca gaactttaac agtgctcatc
8880

75 attggaaaac gttctccggg gcgaaaaccc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt
8940

80

85

90

95

ES 2 346 205 T3

tcgatgtAAC ccactcgTgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt
9000

5 tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggataag ggacacacgg
9060

aaatgttgaa tactcaact cttectttt caatattttt gaagcattta tcagggttat
9120

10 tgcctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg
9180

rgcacatttc cccgaaaaatg gccacctgac gtctaaagaaa ccattttat cagacatta
9240

15 acctataaaa ataggcgat cacaaaggccc ttctgtttc aagaattccg atccagacat
9300

20 gataagatac attgatgagr ttggacaaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt
9360

tatttggaa atttgtgatg ctattgtttt atttgttaacc attagaagct gcaataaaca
9420

25 agttaaacaac aacaattgca ttcatttat gtttcagggtt cagggggagg tttggggagg
9480

tttttaaagc aagtaaaacc tctacaatg tggtagggct gattatgatc taaagccagc
9540

30 aaaagtccca tggcttrata aaaaatgcata gtttcggag gggagcagag aatttgaaag
9600

35 cattttcctg tttagtctttc ttctcgtaga ctttaatttca atacttgatt ctttttcct
9660

cctggacctc agagaggacg cttgggtatt ctgggagaag ttatatttc cccaaatcaa
9720

40 ttctggaa aaacgtgtca cttcaaaatt cctgcattgtat cttgtcaca aagagtctga
9780

ggtggccgg tttttttttt gtttcctggt aaacagaact gctccgact atccaaacca
9840

45 tgcctactttt atttgcata tccgggtttt caataagtct taaggcatca tccaaacttt
9900

50 tggcaagaaa atgagcttct cgtgggggtt ctggggggc tctactgaga actataaaa
9950

ttctgtccctt taaaggcgtttt ttcttctcag gaatggagaa ccaggttttc ctacccataa

55

60

65

ES 2 346 205 T3

10020
5 tcaccagatt ctgtttacct tccactgaag aggttgtggt cattcttgg aagtacttga
10080
actcggtcct gagcggaggc cagggtcggc ctccgttctt gccaatcccc atatttggg
10140
10 acacggcgac gatgcagttc aatggtcgaa ccatgagggc accaagctag ctttttgcaa
10200
aaggcttaggc ctccaaaaaa gcctcctcac tacttctgga atagctcaga ggccggaggcg
10260
15 gcctcgccct ctgcataaat aaaaaaaaaatt aqtcagccat gggggggaga atggggcgaa
10320
ctggggcgag ttaggggcgg gatgggcgg a-ttaggggcg ggactatggt tgctgactaa
20 10380
tttagatgca tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg
10440
25 gttgctgact aatttagatg catgctttgc atacttctgc ctgctggggaa gcctgggac
10500
tttccacacc ctaactgaca cacattccac a
30 10531

30
<210> 5
35 <211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Cadena ligera de inmunoglobulina humanizada

<400> 5

45 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
50 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30
55 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
60

ES 2 346 205 T3

Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

10 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

15 Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

20 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

25 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

30 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

35 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

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

45

<210> 6

<211> 575

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cadena pesada de inmunoglobulina humanizada y IL-2

60

65

ES 2 346 205 T3

<400> 6

5 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 15 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 20 Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 25 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 Met His Leu Lys Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110
 40 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125
 45 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140
 50 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 55 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 60 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190
 65 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

ES 2 346 205 T3

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

5 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

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

15 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

20 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

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

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

35 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

40 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

45 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

50 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

55

60

65

ES 2 346 205 T3

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

5 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Pro Thr Ser Ser Ser
435 440 445

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

15 Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
465 470 475 480

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

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

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

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

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

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

45

50

55

60

65