

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 888 249**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 18160057 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021 EP 3351261**

54 Título: **Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibidoras de linfocitos T para terapia tumoral**

30 Prioridad:

11.10.2011 EP 11184644

10.11.2011 EP 11188625

19.09.2012 EP 12185108

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)

Rämistrasse 71

8006 Zürich, CH

72 Inventor/es:

BECHER, BURKHARD y

VOM BERG, JOHANNES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 888 249 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibitoras de linfocitos T para terapia tumoral

La presente invención se refiere a composiciones y a métodos para tratar cáncer, en particular, a inmunoterapia de enfermedades neoplásicas malignas tales como glioma, mediante la administración de una dosis eficaz de un polipéptido con actividad biológica de IL-12 y un ligando no agonista de un regulador negativo de linfocitos T, en particular, un ligando no agonista de muerte programada (*Programmed Death 1*, PD-1).

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor astrocítico más maligno. El GBM presenta un patrón de crecimiento invasivo y destructor; es el tumor cerebral primario maligno más común y más agresivo en seres humanos, que representa el 20 % de todos los tumores intracraneales. En la mayoría de los países europeos y en América del Norte, la frecuencia de GBM está en el intervalo de 3-3,5 casos nuevos por 100.000 habitantes al año. La historia clínica de la enfermedad es normalmente corta (menos de 3 meses en más del 50 % de los casos) y los pacientes diagnosticados con GBM presentan una supervivencia media de 14-18 meses, a pesar de la cirugía invasiva, de la radiación y de la quimioterapia. La capacidad de los gliomas para resistir a regímenes de tratamiento convencionales es uno de los mayores retos de la neurooncología moderna.

La interleucina (IL)-12 es el prototipo de un grupo de citocinas heterodiméricas con propiedades predominantemente inflamatorias. La IL-12 polariza a los linfocitos T colaboradores que no se han expuesto previamente (naive) para que adopte un fenotipo TH1 y estimula a los linfocitos T citotóxicos y a las células NK. La IL-12 se une al receptor de IL-12 (IL-12R) que es un receptor heterodimérico formado por IL-12R-β1 e IL-12R-β2. El complejo del receptor se expresa principalmente por los linfocitos T, pero también se ha descubierto que otras subpoblaciones de linfocitos son sensibles a IL-12.

Se ha sugerido la aplicación terapéutica de IL-12 en diversas entidades tumorales. Los ensayos clínicos en pacientes de cáncer, sin embargo, se tuvieron que detener debido a que la aplicación sistémica provocó diversos acontecimientos adversos a dosis eficaces, incluyendo víctimas mortales. Aunque la investigación en los últimos años se ha centrado principalmente en diversas vías de administración de IL-12, aún permanecen abiertas cuestiones sobre el mecanismo exacto mediante el cual IL-12 ejerce sus propiedades supresoras de tumores.

PD-1 es un miembro de la extensa familia CD28/CTLA-4 de linfocitos T reguladores. PD-1 se expresa sobre la superficie de linfocitos B, macrófagos y linfocitos T activados. PD-1 (CD279; Uniprot Q15116) tiene dos ligandos, PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273), que son miembros de la familia B7.

Actualmente se están realizando ensayos clínicos con varios anticuerpos anti-PD-L1 (por ejemplo, MDX-1105/BMS-936559) y anticuerpos anti-PD-1 (por ejemplo, MDX-1106/BMS-936558/ONO-4538 o MK-3475/SCH 900475 o AMP-224).

La glucoproteína inmunoglobulina G (IgG) es una molécula efectora principal de la respuesta inmunitaria humoral en el ser humano. Hay cuatro subgrupos distintos de IgG humana, denominados IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cuatro subclases presentan más del 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de las cadenas pesadas, pero difieren con respecto a la estructura y a la flexibilidad de la región bisagra, especialmente en el número de enlaces disulfuro intercatenarios de cadenas pesadas en este dominio. Las diferencias estructurales entre las subclases de IgG también se reflejan en su susceptibilidad a enzimas proteolíticas, tales como papaína, plasmina, tripsina y pepsina.

Solo se conoce una isoforma de IgG4 humana. Al contrario de la IgG1, la IgG2 y la IgG3 humanas, la IgG4 humana no activa el complemento. Además, la IgG4 es menos susceptible a enzimas proteolíticas en comparación con la IgG2 y la IgG3.

Tiozzi et al., Clin Cancer Res 11 (2005): 4168-4175 desvelan la combinación de B7.1, un ligando de CTLA-4, con un vector de expresión vírico que codifica la IL-12, ambos administrados por vía intratumoral.

Sabel et al., Surgery 142 (2007), 749-760 informan del efecto antitumoral inconsistente de la IL-12 en diferentes modelos tumorales.

En Zhong et al., Blood 106 (2005), 1061-1061 se desvela la combinación de IL-12 con un mAb anti-CTLA-4.

Fecci et al., Clin Cancer Res 13 (2007), 2158-2167 hacen referencia al bloqueo sistémico de CTLA-4 que mejora los cambios inducidos por el glioma en el compartimento de linfocitos T CD4+ sin afectar a la función de los linfocitos T reguladores.

Liu et al., Cancer Gene Therapy 9 (2002), 9-15 hacen referencia a que la administración sistémica de la IL-12 recombinante en varios modelos de tumores de roedores, incluyendo carcinomas, sarcomas, melanomas y linfomas,

ha demostrado afectar significativamente sobre el crecimiento del tumor y mejorar la supervivencia.

Ascierto et al., Semin Oncol 27 (2010), 508-516 hacen referencia a que el tratamiento con el mAb anti-PD-I mejoraba la eficacia de la inmunoterapia vacunal con células tumorales secretoras de GM-CSF al aumentar significativamente el número, la fuerza medida por la secreción aumentada de citocinas proinflamatorias, y la duración de la actividad de los linfocitos T citolíticos específicos del tumor.

Mangsbo et al., J Immunother 33 (2010), 225-235 hacen referencia a que la combinación de CpG con el bloqueo de CTL-4 o PD-1 mejoraba la supervivencia a largo plazo y conducía a un aumento de los niveles de linfocitos T reactivos al tumor.

El problema subyacente de la presente invención es la provisión de medios mejorados y de métodos para tratar el cáncer sólido, en particular, glioma.

En el transcurso de un estudio centrado en el potencial terapéutico clínico de IL-12 en GBM de etapa avanzada en un modelo de roedores relevante, sorprendentemente se descubrió que la combinación de IL-12 con un bloqueo de señales co-inhibidoras con anticuerpo anti-PD-1 lleva a la remisión del tumor.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un medicamento de combinación para su uso en la terapia de tumores sólidos, en particular, de tumores cerebrales, en particular, glioma, que comprende

- un polipéptido de IL-12, o un vector de expresión de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido de IL-12, y

- un ligando no agonista seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una molécula similar a un anticuerpo, en donde dicho ligando no agonista es capaz de unirse a uno de PD-1, PD-L1 o PD-L2 con una constante de disociación de al menos 10^{-7} M^{-1} , y en donde dicho ligando no agonista se proporciona como una forma de dosificación para administración sistémica.

En el contexto de la presente invención, un polipéptido de IL-12 es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de p35 (ID de Uniprot 29459, SEQ ID 05) o un homólogo funcional del mismo, y que comprende la secuencia de p40 (ID de Uniprot 29460, SEQ ID 06) o un homólogo funcional del mismo. En una realización, el polipéptido de IL-12 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende tanto secuencias de p35 como de p40 u homólogos de los mismos como parte de la misma cadena continua de aminoácidos. En otra realización, el polipéptido de IL-12 comprende dos cadenas de aminoácidos diferentes, una que comprende la secuencia de p35 y la otra que comprende la secuencia de p40. La terminología "polipéptido de IL-12" no excluye la presencia de secuencias que no son de IL-12, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina y fragmentos de la misma, fusionadas con las secuencias de IL-12 descritas en el presente documento.

El polipéptido de IL-12 tiene una actividad biológica de IL-12. Una actividad biológica de IL-12 en el contexto de la presente invención es la estimulación de células NK o de linfocitos T por dicho polipéptido de IL-12, más notoriamente la estimulación de linfocitos T efectores que actúan a través de perforina.

En una realización del medicamento de combinación, dicho polipéptido de IL-12 comprende una secuencia de polipéptido al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de p35 humana (SEQ ID 05) y una secuencia de polipéptido al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de p40 humana (SEQ ID 06).

La identidad en el contexto de la presente invención es un único parámetro cuantitativo que representa el resultado de una comparación de secuencia posición por posición. Los métodos de comparación de secuencia son conocidos en la materia; el algoritmo BLAST públicamente disponible es un ejemplo.

En una realización, dicho polipéptido de IL-12 es una IL-12 humana recombinante. En una realización, dicho polipéptido de IL-12 es una IL-12 humana sintética. En una realización, dicho polipéptido de IL-12 es un péptido de fusión que comprende el fragmento cristizable (región Fc) de una inmunoglobulina humana. De acuerdo con una realización, el polipéptido IL-12 comprende un fragmento cristizable de inmunoglobulina G humana. Un fragmento cristizable en el contexto de la presente invención se refiere al segundo y tercer dominio constante de la molécula IgG. La región cristizable del fragmento (región Fc) es la región de la cola de un anticuerpo de inmunoglobulina que interactúa con los receptores de superficie celular (receptores Fc) y proteínas del sistema del complemento. En isotipos de anticuerpo IgG, la región Fc está compuesta de dos fragmentos de proteína idénticos, que provienen del segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas de anticuerpo.

De acuerdo con una realización, el polipéptido IL-12 comprende un fragmento cristizable de inmunoglobulina humana G4. De acuerdo con una realización, el polipéptido de IL-12 tiene o comprende la secuencia del SEQ ID 01. De acuerdo con otra realización, el polipéptido de IL-12 comprende una secuencia al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia del SEQ ID 01.

Las realizaciones en las que las cadenas del polipéptido de IL-12 están fusionadas a fragmentos Fc de inmunoglobulina muestran diferentes comportamientos farmacocinéticos en comparación con la citocina recombinante, que para algunas aplicaciones puede conferir un beneficio.

En una realización, el componente del polipéptido de IL-12 del medicamento de combinación se proporciona como una forma de dosificación para la administración o el suministro local (intratumoral). Tal forma de dosificación para la administración local (intratumoral) puede ser una forma de liberación lenta o una forma de liberación prolongada, a partir de la cual se libera dicha IL-12 durante una serie de horas a semanas. En una realización, el componente del polipéptido de IL-12 del medicamento de combinación se administra por administración mejorada por convección (CED, del inglés *convection enhanced delivery*) o una variación de la misma, por ejemplo, el dispositivo mostrado en el documento US2011137289 (A1).

En una realización, el polipéptido de IL-12 se administra sistémicamente junto con el bloqueo sistémico de PD-1/PD-L1/PD-L2.

En el contexto de la presente invención, un ligando no agonista de PD-1 es una molécula que se une de manera selectiva a PD-1 en condiciones que prevalecen en la sangre periférica, sin desencadenar el efecto biológico de la interacción de PD-1 con cualquiera de los ligandos fisiológicos de PD-1, en particular, PD-L1 o PD-L2. Un ligando no agonista de PD-L1 (PD-L2) es una molécula que se une de manera selectiva a PD-L1 (o a PD-L2) en condiciones que prevalecen en la sangre periférica, sin desencadenar el efecto biológico de la interacción de PD-L1 (PD-L2) con cualquiera de sus ligandos fisiológicos, en particular, PD-1.

En algunas realizaciones, dicho ligando no agonista de PD-1 es un polipéptido que se une a PD-1.

Un ligando no agonista de PD-1 o un ligando no agonista de PD-L1 (PD-L2) en el sentido de la invención se refiere a una molécula que es capaz de unirse a PD-1 (PD-L1, PD-L2) con una constante de disociación de al menos 10^{-7} M^{-1} , 10^{-8} M^{-1} o 10^{-9} M^{-1} y que inhibe la actividad biológica de su respectiva diana.

Un ligando no agonista del polipéptido puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula de tipo anticuerpo o un oligopéptido, cualquiera de los cuales se une a y por lo tanto inhibe PD-1 o PD-L1 (PD-L2), respectivamente.

Un fragmento de anticuerpo puede ser un dominio Fab o un dominio Fv de un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de cadena simple, que es una proteína de fusión que consiste en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo conectado mediante un enlazador peptídico. El inhibidor también puede ser un anticuerpo de dominio único, que consiste en un dominio variable aislado de una cadena pesada o ligera. Adicionalmente, un anticuerpo también puede ser un anticuerpo de cadena pesada que consiste solo en cadenas pesadas tales como los anticuerpos hallados en camélidos. Una molécula de tipo anticuerpo puede ser una proteína de repetición, tal como una proteína de repetición de ankyrina diseñada (Molecular Partners, Zúrich).

En particular, un ligando no agonista de PD-1 o un ligando no agonista de PD-L1 o un ligando no agonista de PD-L2 no lleva a una actividad atenuada de linfocitos T cuando se une a PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente, en la superficie de un linfocito T. En determinadas realizaciones, la expresión "ligando no agonista de PD-1" abarca tanto antagonistas de PD-1 como ligandos que son neutros ante la señalización de PD-1. En algunas realizaciones, los ligandos no agonistas de PD-1 usados en la presente invención son capaces, cuando se unen a PD-1, de bloquear de manera estérica la interacción de PD-1 con sus compañeros de unión PD-L1 y/o PD-L2.

En algunas realizaciones, dicho ligando no agonista de PD-1 es una gamma inmunoglobulina que se une a PD-1, sin desencadenar la respuesta fisiológica de la interacción de PD-1 con sus compañeros de unión PD-L1 y/o PD-L2.

En algunas realizaciones, dicho ligando no agonista de PD-L1 es una gamma inmunoglobulina que se une a PD-L1 (PD-L2), sin desencadenar la respuesta fisiológica de la interacción de PD-1 con sus compañeros de unión PD-L1 y/o PD-L2.

Son ejemplos no limitantes de ligandos de PD-1/ PD-L1 o PD-L2 los anticuerpos MDX-1105/BMS-936559, MDX-1106/BMS-936558/ONO-4538, MK-3475/SCH 900475 o AMP-224, actualmente en desarrollo clínico.

El término "gamma inmunoglobulina" en este contexto pretende abarcar tanto moléculas de inmunoglobulinas completas como fragmentos funcionales de las mismas, en donde la función es la unión a PD-1 o PD-L1 (PD-L2) tal como se describe anteriormente.

En una realización, la terapia de combinación comprende dos formas de dosificación diferentes, en donde dicho polipéptido de IL-12 se proporciona como una forma de dosificación para la administración intratumoral o la administración local en las proximidades del tumor, y dicho ligando no agonista de PD-1 se proporciona como una forma de dosificación para la administración sistémica, en particular, mediante inyección intravenosa. Sin embargo,

dicho ligando no agonista de PD-1 también se puede aplicar localmente del mismo modo que el polipéptido de IL-12. De acuerdo con otra realización, el polipéptido de IL-12 se aplica directamente al nódulo linfático que drena el tumor.

De acuerdo con otra realización, la terapia de combinación comprende una forma de dosificación mediante la cual dicho polipéptido de IL-12 se proporciona para la administración intracraneal, por ejemplo, mediante inyección.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento de combinación tal como se expone anteriormente, para su uso en un método de terapia de una enfermedad neoplásica maligna, en particular, lesiones de cáncer sólido. En una realización, la neoplasia maligna es glioma. En una realización, la neoplasia maligna es un tumor cerebral secundario (metástasis cerebral de una lesión neoplásica que se origina fuera del cerebro). En una realización, la enfermedad es glioblastoma multiforme. En una realización, la neoplasia maligna es meningioma. En una realización, la neoplasia maligna es melanoma. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de páncreas. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de pulmón. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de próstata. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de vejiga.

Las lesiones cancerosas son propensas a expandirse en el tejido próximo, así como en distintas localizaciones en el cuerpo, dependiendo de su origen. El 20-40 % de todos los cánceres desarrollan metástasis cerebral; entre ellos, el cáncer de mama y de piel (melanoma) son las fuentes más comunes de metástasis cerebral (Sofietti et al., J Neurol 249, 1357-1369 (2002)). De manera similar a los tumores cerebrales malignos primarios, las metástasis cerebrales tienen un pronóstico malo a pesar del tratamiento y son rápidamente letales. Los linfocitos T son la población de células efectoras cruciales para el rechazo del tumor mediado por IL-12 en el cerebro. El tratamiento de combinación de IL-12 junto con anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-PD-L2 se dirige especialmente a los linfocitos T para activarlos y repolarizarlos. Dado que la metástasis cerebral crece en el mismo compartimento inmunológico que los tumores cerebrales primarios, los pacientes que padecen tumores cerebrales secundarios también se benefician del tratamiento de combinación.

En una realización, el medicamento de combinación comprende un polipéptido de IL-12 que tiene una actividad biológica de IL-12 proporcionada como una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la p40 humana, la secuencia de aminoácidos de la p35 humana y el fragmento cristizable de la IgG4 humana, formulándose dicho polipéptido de IL-12 como una forma de dosificación para la administración intratumoral. De acuerdo con esta realización, el medicamento de combinación comprende adicionalmente una inmunoglobulina G generada contra PD-1 como un ligando no agonista de PD-1 formulado como una forma de dosificación para la administración sistémica. De acuerdo con esta realización, el medicamento de combinación se proporciona para el tratamiento de enfermedades neoplásicas malignas, en particular, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

De acuerdo con una alternativa de la invención, una terapia de combinación comprende un vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 que codifica un polipéptido de IL-12 codificado que tiene una actividad biológica de IL-12 y un ligando no agonista de PD-1, PD-L1 o PD-L1.

El ligando no agonista de PD-1 puede estar realizado por polipéptidos, en particular, por anticuerpos, tal como se expone anteriormente. Un ejemplo no limitante para un polipéptido de IL-12 codificado es un fragmento cristizable de inmunoglobulina G fusionado a las cadenas de polipéptidos constituyentes de IL-12, IL-12 humana o un equivalente funcional de las mismas. Un ejemplo no limitante es una construcción de fusión que tiene los polipéptidos constituyentes de IL-12 enlazados por una secuencia de aminoácidos corta tal como se representa en la Fig. 1, cuya secuencia de aminoácidos se da como SEQ ID 01 y la secuencia codificante de ácido nucleico se da como SEQ ID 07.

La ventaja de usar proteínas de fusión de citocinas y el fragmento cristizable de las inmunoglobulinas en lugar de la citocina recombinante es una farmacocinética mejorada (Belladonna et al. J Immunol 168, 5448-5454 (2002); Schmidt, Curr Opin Drug Discov Devel 12, 284-295 (2009); Eisenring et al., Nat Immunol 11, 1030-1038 (2010)).

El vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 de acuerdo con este aspecto de la invención puede, a modo de ejemplo no limitante, ser un plásmido de expresión de ADN "desnudo" que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de IL-12 bajo el control de una secuencia promotora operable en una célula tumoral humana, para la administración en el tumor, por ejemplo, mediante inyección intracraneal. El vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 puede ser de manera similar un vector vírico, por ejemplo, un virus adenoasociado, un adenovirus, un lentivirus o un virus herpes.

Tal vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 se puede proporcionar como una forma de dosificación para la administración intratumoral en combinación con un ligando no agonista de PD-1 tal como se expone anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1a muestra la estructura y secuencia de la proteína de fusión dada en la SEQ ID 01. Las subunidades p40 y p35 de IL-12 se representan como rectángulos. Estas subunidades se conectan mediante un enlazador

(G₄S)₃. Las subunidades CH2, CH3 y los seis últimos aminoácidos de CH1 del fragmento cristizable de la inmunoglobulina se muestran como círculos oblongos.

- Fig. 1b muestra la proteína de fusión dada en la SEQ ID 01, la imagen de la izquierda muestra una inmunotransferencia usando condiciones reductoras, desarrollada con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano acoplado con HRP, la imagen de la derecha muestra una tinción de plata de la proteína de fusión en condiciones no reductoras (DTT -) y en condiciones reductoras (DTT+)
- Fig. 1c muestra la producción de IFN- γ en monocitos de sangre periférica humana (PBMC) tal como se evalúa mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las células se estimularon bien con IL-12 humana recombinante heterodimérica comercialmente disponible (rhIL-12) o con la proteína de fusión purificada dada SEQ ID 01 (hIL-12Fc) en presencia de un anticuerpo dirigido contra CD3 (estimulación de linfocitos T policlonales). Sin estímulo: sin estimulación de IL-12 ni estimulación de anti-CD3 (control de valores iniciales). El experimento se realizó por triplicado, las barras de error denotan datos de e.e.m. representativos de tres experimentos independientes
- Fig. 2 muestra la inmunohistoquímica de secciones tumorales fijadas con formalina obtenidas a partir de ratones singénicos C57/Bl6 5 semanas tras la exposición con 2×10^4 células GI261 IL-12Fc o GI261 Fc y teñidas con anticuerpo contra F4/80, tinción de contraste de hematoxilina (ejemplos representativos, n=6 ratones por grupo). La barra de escala indica 2 mm, la punta de la flecha indica el tumor residual GI261 IL-12Fc (SEQ ID 02).
- Fig. 3 muestra la obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) no invasiva de glioma de ratones en ratones C57/Bl6 singénicos (n = 5-6 ratones por grupo) tras la implantación de 2×10^4 células GI261 que expresan de manera constitutiva luciferasa de *Photinus pyralis* y que libera una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (GI261 IL-12Fc, (SEQ ID 02)) o solo Fc como control (GI261 Fc). Panel superior: Cuantificación de crecimiento tumoral que se correlaciona con el flujo de fotones (f/s) en la región de interés (RDI) frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas. Panel inferior: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.
- Fig. 4 muestra la obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) no invasiva de glioma de ratones en animales de TS y en diferentes ratones mutantes (n = 5-7 ratones por grupo) tras la implantación de 2×10^4 células GI261 que expresan de manera constitutiva luciferasa de *Photinus pyralis* y que libera una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (GI261 IL-12Fc, (SEQ ID 02)). Panel superior: Cuantificación del crecimiento tumoral mediante obtención de imágenes por BLI frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas. Panel inferior: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. A) se implantaron GI261 IL-12Fc en ratones que carecen de linfocitos T y de linfocitos B (*Rag1*^{-/-}) o de células NK (*Il-5ra*^{-/-}) o que carecen tanto de linfocitos T como de linfocitos B y de células NK y de células de tipo inductor de tejido linfoide (*Rag2*^{-/-} *Il2rg*^{-/-}). B) se implantaron GI261 IL-12Fc en ratones deficientes para el MHCII (*Ia(b)*^{-/-}) y el MHCI ($\beta 2m$ ^{-/-}). (n=5-8 ratones/grupo), que carecen de linfocitos T CD4 o CD8 positivos, respectivamente. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.
- Fig. 5 muestra la formación de linfocitos T de memoria en animales de ts supervivientes que se han expuesto previamente a células 2×10^4 GI261 IL-12Fc (SEQ ID 02). Se muestran los ejemplos de bioluminiscencia emitida a partir de los cerebros de animales de ts supervivientes que se han vuelto a exponer a células GI261 Fc en comparación con los animales de ts sin exposición previa (panel superior, días 1, 7 y 21 tras la reexposición). Además, se muestra la bioluminiscencia de los tumores en fotones por segundo (f/s) en la región de interés (RDI) frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas (panel inferior). Se observó un rechazo rápido de los tumores de control en los animales de ts supervivientes. Mientras que la luminiscencia medida el día 1 sugirió una metástasis idéntica en los dos grupos, solo los ratones sin exposición previa presentaron una señal medible el día 7 en adelante, lo que sugiere una respuesta de memoria anti-glioma de eliminación rápida y eficaz ahora independiente de citocinas proinflamatorias expresadas ectópicamente (es decir, IL-12Fc, (SEQ ID 02)). (n=4-6 ratones/grupo). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.
- Fig. 6 muestra la obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) no invasiva de glioma de ratones en diferentes ratones mutantes (n = 4-8 ratones por grupo) tras la implantación de 2×10^4 células GI261 Fc que expresan de manera constitutiva luciferasa de *Photinus pyralis* y que libera una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (GI261 IL-12Fc (SEQ ID 02)). A) animales de ts (círculos blancos) y *IFN γ* ^{-/-} (círculos negros) B) animales de ts (círculos blancos) y *Perforina*^{-/-} (círculos negros). Se muestra la cuantificación de crecimiento tumoral que se correlaciona con el flujo de fotones (f/s) en la región de interés (RDI) frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas (panel superior). Panel inferior: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Fig. 7 muestra el crecimiento tumoral en ratones de ts inoculados con 2×10^4 células GI261 Fc. El tratamiento comenzó el día 21 (flechas). Se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran IL-12Fc (SEQ ID 02) (o PBS). Los animales recibieron inyecciones por vía i.p. de anticuerpos que bloquean α CTLA-4 o de PBS comenzando el día 22, seguido de inyecciones tal como se indica en la figura. Gráfico superior: cuantificación del flujo de protones en la RDI de animales de ts portadores de tumor que recibieron el tratamiento indicado. Gráfico inferior: análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales anteriores; PBS/PBS frente a IL-12Fc/ α CTLA-4 $p=0,0045$, PBS/PBS frente a IL-12Fc/PBS $p=0,3435$, PBS/ α CTLA4 frente a IL-12Fc/ α CTLA-4 $p=0,0101$; Test de Log-rank (Mantel-Cox). Datos representativos de tres experimentos independientes con 2-5 animales por grupo

Fig. 8 muestra la inmunohistoquímica de secciones tumorales obtenidas de ratones singénicos C57/BI6 tras la exposición a células GI261 Fc el día 21 y tras la administración local de IL-12Fc (SEQ ID 02) en combinación con el bloqueo sistémico de CTLA-4 tal como se describe en el Ejemplo 5. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. La barra de escala indica 2 mm.

Fig. 9 muestra el crecimiento tumoral en ratones de ts inoculados con 2×10^4 células GI261 Fc. El tratamiento comenzó el día 21 (flechas). Se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran IL-12Fc (SEQ ID 02). Los animales recibieron inyecciones por vía i.p. de anticuerpos que bloquean α PD-1 o anticuerpos de isotipo de control comenzando el día 22, seguido de inyecciones tal como se indica en la figura. Gráfico superior: cuantificación del flujo de protones en la RDI de animales de ts portadores de tumor que recibieron el tratamiento indicado. Gráfico inferior: análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales anteriores; PBS/isotipo frente a IL-12Fc/ α PD-1 $p=0,0064$, Test de Log-rank (Mantel-Cox). Datos representativos de un experimento con 5-6 animales por grupo.

Fig. 10 muestra el crecimiento en ratones de ts inoculados con células 50 B16-F10. El tratamiento comenzó el día 5 (flecha). Se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran IL-12Fc (SEQ ID 02). Los animales recibieron inyecciones por vía i.p. de anticuerpos que bloquean α CTLA-4 o de PBS comenzando el día 6, seguido de inyecciones tal como se indica en la figura. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier PBS/PBS frente a IL-12Fc/ α CTLA-4 $p=0,0028$, Test de Log-rank (Mantel-Cox). Datos representativos de un experimento con 6 animales por grupo.

Fig. 11 muestra la administración sistémica de IL-12 heterodimérica recombinante en combinación con el bloqueo de CTLA4. Se inyectaron 2×10^4 células GI261 Fc en el cuerpo estriado derecho de ratones de ts y se siguió el tumor durante 90 días. Tratamiento sistémico: en el día 21 (flecha), los animales portadores de tumor se trataron inicialmente con 200 μ g de IgG2b de ratón α CTLA-4 (9D9) (triángulos rellenos de gris claro, $n=8$), 200 ng de IL-12 heterodimérica recombinante (rIL-12) (triángulos rellenos de gris oscuro, $n=9$) o una combinación de ambos (triángulos rellenos de negro, $n=9$) por inyección intraperitoneal (i.p.). El grupo de control recibió solución salina tamponada con fosfato (PBS) (triángulos sin relleno, $n=7$). El tratamiento se mantuvo con 100 μ g de α CTLA-4 o 100 ng de rIL-12 o una combinación de ambos 3 veces/semana hasta el final del experimento. Gráfico superior: cuantificación del flujo de protones en la RDI de animales de ts portadores de tumor que recibieron el tratamiento indicado. Gráfico inferior: análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales anteriores; Se usó un test Log-rank (Mantel-Cox) para calcular los p-valores indicados; datos agrupados de dos experimentos independientes.

Ejemplos

Métodos

Animales

Los ratones C57BL/6 se obtuvieron de Janvier; los ratones $b2m^{-/-}$, $la(b)^{-/-}$, $Il2rb2^{-/-}$, $Rag1^{-/-}$, $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$, $Prf1^{-/-}$ e $lfn g^{-/-}$ se obtuvieron de Jackson Laboratories. Los ratones $Il5ra^{-/-}$ se proporcionaron por S. Bulfone-Paus. Todos los animales se mantuvieron enjaulados en condiciones específicas libres de patógenos con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y con comida y agua a voluntad. Todos los experimentos con animales se aprobaron por la oficina veterinaria cantonal de Suiza (16/2009).

Líneas de células tumorales de ratón

Las células de glioma de murino C57/BI6 (GI261) (generosamente proporcionadas por A. Fontana, Inmunología Experimental, Universidad de Zúrich) se transfectaron con pGI3-ctrl (Promega) y pGK-Puro (generosamente proporcionadas por T. Buch, Universidad Técnica, Munich). Las construcciones linealizadas se electroporaron en una proporción de 10:1 usando un multiporador de eppendorf, después se seleccionaron con 0,8 μ g/ml de puomicina (Sigma-Aldrich) para generar células GI261 estables para luciferasa. Se aisló un único clon mediante dilución limitante y se pasó *in vivo* mediante inoculación de tumor intracraneal, seguido por la disociación del tumor tras 4 semanas y la reselectión en 0,8 μ g/ml de puomicina. Posteriormente, las células se electroporaron con

pCEP4-mIgG3, pCEP4-mIL-12mIgG3 (SEQ ID 09) y pCEP4-mIL-23mIgG3 (SEQ ID 08) (Eisenring et al, 2010) y se seleccionó la carga con 0,8 µg/ml de puromicina y 0,23 mg/ml de higromicina (Sigma-Aldrich). La producción de citocina se detectó mediante ELISA (OptEIA IL-12/23p40, BD Pharmingen) y rt-PCR (IgG3fw: ACACACAGCCTGGACGC (SEQ ID 03) IgG3rev: CATTTGAACTCCTTGCCCCCT (SEQ ID 04)). las células GI261 y las líneas celulares derivadas se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco, Invitrogen) complementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS, del inglés *fetal calf serum*) en presencia de antibióticos de selección tal como se indica anteriormente a 37 °C y CO₂ al 10 %. Las células de melanoma murino B16-F10 se obtuvieron de ATCC.

Expresión y purificación de IL-12Fc

La IL-12Fc (SEQ ID 02) se expresó en células 293T tras la transfección mediada por fosfato de calcio de acuerdo con los protocolos estándar con 45 µg de ADN vectorial (pCEP4-mIL-12IgG3, SEQ ID 09)/placa de cultivo tisular de 15 cm. El sobrenadante se recolectó 3 días y 6 días tras la transfección, se hizo un filtrado estéril y se diluyó a 1:1 en PBS. La proteína se purificó usando un purificador (ÄktaPrime) sobre una columna de proteína G (1 ml, HiTrap, GE Healthcare) eluida con 0,1 M de glicina a pH 2 y se dializó toda la noche en PBS a pH 7,4. La concentración y la pureza de IL-12Fc (SEQ ID 02) se midió mediante ELISA (OptEIA IL-12/23p40, BD Pharmingen) y SDS-PAGE seguido por tinción de plata e inmunotransferencia. La IL-12Fc se detectó con un anticuerpo anti-IL12p40 de ratón en rata (C17.8, BioExpress) y un anticuerpo anti-rata en cabra acoplado a HRP (Jackson). Se usó el mismo procedimiento para la expresión de IL-12Fc humana (SEQ ID 01,07).

Caracterización de IL-12Fc humana

La concentración y la pureza de la IL-12Fc humana (SEQ ID 01) se midió mediante ELISA (IL-12 (p70) humana, Mabtech, n.º 2455-1H-6) y SDS-PAGE seguido por tinción de plata e inmunotransferencia. El marcador de IgG4 humana se detectó con un anticuerpo anti-IgG humana en cabra acoplado a HRP (n.º A0170, Sigma). Para la caracterización funcional de la IL-12Fc (SEQ ID 01), las PBMC, adquiridas de acuerdo con las directrices éticas de la Universidad de Zúrich, se colocaron en placas a 100.000 células por pocillo en medio RPMI complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 % en placas de 96 pocillos y se estimularon bien con IL-12 humana recombinante (Peprotech) o IL-12Fc humana (SEQ ID 01). Ambas citocinas se normalizaron entre sí de acuerdo con las concentraciones derivadas del ELISA de IL-12p70 humana (Mabtech, n.º 2455-1H-6). Las PBMC se estimularon en presencia de 1 µg/ml de un anticuerpo de IgG2a anti-CD3 humano en ratón (OKT3, Bio-X-cell). Tras dos días de cultivo en CO₂ al 5 % y a 37 °C, el sobrenadante se cultivó y se sometió a un ELISA de anti-IFN-γ humano (Mabtech, n.º 3420-1H-6).

Inoculación de glioma ortotópico

En resumen, los ratones de 6-10 semanas de edad se inyectaron por vía i.p. con Flunixinim (Biokema, 5 mg/kg de peso corporal) antes de anestésarlos con isoflurano al 3-5 % (Minrad) en una cámara de inducción. Se afeitaron sus cabezas con una maquinilla eléctrica. Tras montarlos en un marco estereotáctico (David Kopf instruments), se desinfectó el cuero cabelludo de los animales con solución de yodo al 10 % y se realizó una incisión en la piel a lo largo de la línea media. La anestesia en el marco estereotáctico se mantuvo al 3 % de isoflurano administrada a través de un adaptador nasal (David Kopf Instruments). Posteriormente, se montó una jeringa de extremo romo (Hamilton, 75N, 26s/2"/2, 5µl) sobre una bomba de microinyección sobre el brazo manipulador y se colocó a 1,5 mm lateral y a 1 mm frontal del bregma. La aguja se bajó al orificio de la fresa perforado manualmente a una profundidad de 4 mm por debajo de la superficie de la duramadre y se retrajo 1 mm para formar un pequeño reservorio. Usando la bomba de microinyección (UMP-3, World Precision Instruments Inc.) se inyectaron 2x10⁴ células en un volumen de 2 µl a 1 µl/min. Tras dejar la aguja en el lugar durante 2 minutos, se retrajo a 1 mm/min. El orificio de la fresa se cerró con cera para huesos (Aesculap, Braun) y la herida del cuero cabelludo se selló con adhesivo tisular (Indermil, Henkel).

Obtención de imágenes bioluminiscentes in vivo

Los ratones que portan el tumor se pesaron cuidadosamente, se anestésaron con isoflurano (2-3 %) y se inyectaron con D-Luciferina (150 mg/kg de peso corporal, CaliperLifesciences). Los animales se transfirieron a la cámara oscura de un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS 100 (CaliperLifesciences), la anestesia se mantuvo al 2 % de isoflurano a través de conos nasales. La luminiscencia se registró 10 minutos después de la inyección. Los datos se analizaron posteriormente usando el programa informático Living Image 2.5 (CaliperLifesciences). Una región circular de interés (RDI; 1,46 cm Ø) se definió alrededor de la cabeza de los animales y el flujo de protones de esta región se leyó y se representó gráficamente.

Tratamiento de los gliomas establecidos

El d21 tras la implantación de las células de glioma, los animales que portan el tumor se distribuyeron de manera uniforme entre los grupos experimentales basándose en su flujo de fotones en RDI. Los animales con un flujo en la RDI de menos de 1x10⁵ f/s se consideraron como no aceptores y se excluyeron. 40-48 horas antes de la

implantación (2 días antes del comienzo del tratamiento), las bombas osmóticas (Modelo 2004, 0,25 µl/h; Alzet) se rellenaron con IL-12Fc de murino (SEQ ID 02, 8,33 ng/µl en PBS) o solo PBS y se cebaron a 37 °C en PBS. Inmediatamente antes de la cirugía, se inyectó a los ratones con Flunixin por vía i.p. (Biokema, 5 mg/kg de peso corporal). Se anestesió a los ratones con isoflurano al 3-5 %, se desinfectó el cuerpo cabelludo y se realizó una incisión en la línea media. Se localizó el orificio de la fresa anterior de la inyección de glioma, se retiró la cera para hueso y el periostio y se colocó la bomba en una bolsa de piel formada en la espalda del animal. La cánula de infusión se bajó a través del orificio de la fresa 3 mm hacia el centro putativo del tumor. La cánula se conectó a la bomba (kit de infusión cerebral III 1-3 mm, Alzet) mediante un tubo de silicona y se mantuvo en su lugar con adhesivo de cianoacrilato. La piel se suturó con un hilo de nylon 4-0. Después de la cirugía, los ratones se trataron durante 3 días con Borgal al 0,1 % (v/v) (Intervet) en el agua que bebían. Las bombas se explantaron el día 49. Se inyectaron por vía i.p. cinco dosis de anticuerpos de IgG2b de ratón anti-CTLA-4 de ratón (clon 9D9, bio-X-cell; Peggs et al.; J Exp Med 206, 1717-1725 (2009)) o un volumen equivalente de PBS los días 22 (200 µg), 26 (100 µg), 29 (100 µg), 35 (100 µg) y 42 (100 µg).

Como alternativa, los animales recibieron IgG2a de rata anti-PD-1 de ratón (clon RMP1-14, bio-X-cell) o anticuerpos de control de isotipo IgG2a de rata (clon 2A3, bio-X-cell) para el experimento representado en la figura 9. Las pautas de dosificación y la vía de aplicación fue idéntica con el experimento representado en la figura 7. Para el tratamiento de tumores cerebrales derivados de B16-F10, se implantaron las bombas el día 5 tras la inyección, se inyectaron por vía i.p. anticuerpos IgG2b de ratón anti-CTLA-4 de ratón (clon 9D9, bio-X-cell; Peggs et al.; J Exp Med 206, 1717-1725 (2009)) o un volumen equivalente de PBS en los días 6 (200 µg), 11 (100 µg), 13 (100 µg) y 19 (100 µg).

Análisis de supervivencia de los animales portadores de tumores

Los animales que portaban tumores se controlaron mediante BLI, se revisaron los síntomas neurológicos y se pesaron semanalmente hasta el día 21 tras la inoculación de glioma. Los animales de GI261 Fc que presentaron un flujo en la RDI de menos de 1×10^5 f/s en el día 21 se consideraron como no aceptores o aceptores lentos del tumor y se excluyeron del análisis de supervivencia (5-10 %). Desde el día 21 en adelante, los animales se revisaron diariamente. Los animales que presentaban síntomas tales como apatía, una postura encorvada grave y/o pérdida de peso de más del 20 % del peso máximo se sacrificaron. Los ratones que portaban el tumor B16-F10 se puntuaron diariamente comenzando desde el día 5 hasta el final del experimento de acuerdo con el mismo esquema.

Histología

Para la histología, los animales se sacrificaron con CO₂, se perfundieron por vía transcardíaca con PBS enfriado en hielo y se decapitaron. Se aislaron cuidadosamente los cerebros completos, se fijaron en formalina al 4 %, se embebieron en parafina y se generaron secciones de 3 µm para la tinción de HE y/o inmunohistoquímica para detectar F4/80 (BM8; BMA biomedical). Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa de rábano picante. La tinción se visualizó con 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) como sustrato de HRP. Las imágenes se generaron usando un microscopio de luz Olympus BX41 equipado con una cámara Olympus ColorViewIIIu y un programa informático de adquisición de imágenes Olympus cell[^]B. Las vistas generales de las secciones de cerebros completos se recortaron usando Adobe Photoshop CS3.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, se usó un test Log-rank (Mantel-Cox) para calcular los p-valores indicados en las respectivas figuras. Los p-valores de menos de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis se realizó con GraphPad Prism versión 5.0a para Mac OSX (GraphPad Software Inc).

Ejemplo 1: La expresión intratumoral de IL-12Fc promueve la eliminación de los gliomas experimentales

Los presentes inventores han diseñado y clonado una proteína de fusión que consiste en la subunidad p40 de la IL-12 humana unida mediante un enlazador peptídico flexible a la subunidad p35. Esta construcción de cadena simple se fusionó entonces a la región constante de la cadena pesada de la IgG4. (Fig. 1A). Los presentes inventores denominaron esta proteína de fusión de cadena simple humana IL-12Fc (SEQ ID 01). Los presentes inventores expresaron esta proteína en células embrionarias de riñón humano HEK293 y detectaron una forma dímera así como una forma monómera en condiciones naturales. En condiciones reductoras solo se detectó la forma monómera (Fig. 1B). La IL-12Fc (SEQ ID 01) tiene propiedades funcionales similares a la IL-12 heterodímera comercialmente disponible (obtenido de Peprotech). Para determinar si la IL-12Fc (SEQ ID 01) podría ser adecuada para superar el entorno inmunosupresor local inducido por gliomas y para arrojar luz sobre los mecanismos efectores implicados, los inventores expresaron una versión de murino (Belladonna et al. J Immunol 168, 5448-5454 (2002), IL-12Fc (SEQ ID 02)) de esta citocina en células GI261 de glioma de ratón. Para medir el crecimiento tumoral intracraneal de manera no invasiva mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI, del inglés *bioluminescence imaging*), los presentes inventores generaron en primer lugar una línea de GI261 que expresa de manera constitutiva luciferasa de *Photinus pyralis*. Los presentes inventores denominaron a esta línea celular GI261-luc. A continuación, los presentes inventores modificaron esta línea celular para liberar de manera continua una proteína de fusión de IL-12 y el

fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (IL-12Fc; SEQ ID 02, 09) o Fc (SEQ ID 08) solo como un control (denominados 'GI261 IL-12Fc' y 'GI261 Fc', respectivamente). La secuencia de proteína de murino elegida de la construcción de fusión es homóloga a la variante humana (SEQ ID 01) y consiste en las subunidades p40 y p35 de la IL-12 que están conectadas a través de un enlazador (G4S)₃ y las subunidades CH2, CH3 y los seis últimos aminoácidos de CH1 de IgG3, mientras que CH1 y CH2 están conectadas por una región bisagra. Los vectores para la expresión del fragmento de control y la construcción de fusión de IL-12 se representan en la SEQ ID 08 y 09, respectivamente. La intención de usar proteínas de fusión en lugar de la citocina recombinante fue ver si presentarían una farmacocinética mejorada. Los presentes inventores confirmaron la secreción de IL-12Fc (SEQ ID 02) mediante ELISA para las subunidades p40 y p70. Los presentes inventores confirmaron adicionalmente la expresión de la cola Fc mediante RT-PCR. Cuando se implantó por vía intracraneal en el cuerpo estriado derecho, las lecturas de bioluminiscencia y el volumen tumoral tal como se evalúan mediante métodos estereológicos presentaron una fuerte correlación (datos no mostrados).

A continuación, los presentes inventores implantaron GI261 IL-12Fc y Fc en el cuerpo estriado derecho de ratones C57Bl/6 y tras el crecimiento tumoral a través de obtención no invasiva de imágenes por bioluminiscencia (BLI). Tras un aumento inicial en la luminiscencia, todos los grupos presentaron una bajada alrededor del día 14 tras la inyección. Los animales que portan tumores que expresan Fc presentaron un fuerte aumento en BLI y pronto alcanzaron los criterios de exclusión, a veces incluso antes del día 35 tras la inyección. En contraste, las lecturas de BLI para animales que se habían inyectado con tumores de GI261 que expresa IL-12Fc cayeron a niveles cerca del límite de detección en el día 21 en adelante (datos no mostrados). De acuerdo con esta observación, los presentes inventores solo pudieron detectar un tumor residual en algunos animales en este grupo, mientras que los animales inyectados con Fc de control presentaron una fuerte formación de tumor cuando se analizaron histológicamente (Fig. 2). Cuando los presentes inventores siguieron animales a los que habían implantado células GI261 IL-12Fc o GI261 Fc durante hasta 90 días, los presentes inventores observaron rechazo del tumor en una alta proporción de ratones que llevan tumores que secretan IL-12Fc tras un establecimiento inicial (Fig. 3).

Ejemplo 2: Los linfocitos T son el tipo principal de células efectoras del rechazo de glioma mediado por IL-12Fc.

Para confirmar que la secreción de IL-12Fc por GI261 IL-12Fc actúa sobre el hospedador en lugar de en las propias células tumorales, los presentes inventores observaron que el crecimiento de GI261 IL-12Fc y GI261 Fc es el mismo en ratones que carecen del receptor para IL-12. El crecimiento desenfrenado de GI261 IL-12 en animales *IL-12 β 2^{-/-}* demuestra que IL-12Fc actúa específicamente sobre un tipo celular en el ratón receptor (datos no mostrados). Los linfocitos T y las células NK están entre los leucocitos más sensibles a IL-12. Para ensayar de manera sistemática la relevancia funcional del influjo mediado por IL-12Fc de estas células, los presentes inventores expusieron a una serie de ratones mutantes a GI261 IL-12Fc intracraneal. Los presentes inventores implantaron células GI261 IL-12Fc en ratones que carecen de linfocitos T y de linfocitos B (*Rag1^{-/-}*) o de células NK convencionales (*IL-15 α ^{-/-}*) o en ratones que carecen tanto de linfocitos T como de linfocitos B, de células NK y de células de tipo inductor de tejido linfoide (*Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}*) (Fig. 4A). Tras una fase de retraso inicial hasta el día 14 tras la inyección, todos los grupos presentaron un fuerte aumento en luminiscencia hasta el día 28, reflejando un fuerte crecimiento tumoral. Entre los días 28 y 42, la mayoría de los animales sucumbieron a los tumores. Solo los ratones de ts y *IL-15 α ^{-/-}* fueron capaces de controlar el tumor y presentaron una supervivencia prolongada en comparación con los animales *Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}* y *Rag1^{-/-}*. Aunque los linfocitos T o los linfocitos B parecieron ser cruciales para el rechazo de glioma mediado por IL-12Fc, la capacidad de los ratones *IL-15 α ^{-/-}* para rechazar GI261 IL-12 indica que las células NK eran en gran medida prescindibles.

A continuación, los presentes inventores investigaron la contribución de los linfocitos T CD4 y CD8 positivos usando ratones deficientes en el MHCII (*Ia(b)^{-/-}*) y en el MHCI (*β 2m^{-/-}*). Al contrario que los ratones de ts, los ratones *Ia(b)^{-/-}* que carecen de linfocitos T CD4 no pudieron controlar los tumores GI261 IL-12Fc, y los ratones *β 2m^{-/-}* sucumbieron al glioma poco después (Fig. 4B). La supervivencia en ambos grupos mutantes se acortó en comparación con el grupo de tipo silvestre. Estos datos demuestran claramente que el rechazo del tumor mediado por IL-12Fc depende de la actividad de los linfocitos T, incluyendo los linfocitos T colaboradores y los CTL.

Ejemplo 3: La respuesta de memoria antitumoral es independiente de IL-12Fc expresado ectópicamente.

Para investigar adicionalmente el carácter del control tumoral dependiente de linfocitos T, los presentes inventores probaron a los animales de ts supervivientes que se habían expuesto previamente a células GI261 IL-12Fc para la formación de linfocitos T de memoria (Fig. 5). Los animales se trataron tal como se describe en la Fig. 3 / ejemplo 1. Al contrario de la exposición primaria, los presentes inventores inyectaron en este caso células GI261 Fc en el hemisferio contralateral de los animales de supervivientes o de los ts sin exposición previa. Los presentes inventores observaron un rechazo rápido de los tumores de control en días. Mientras que la luminiscencia medida el día 1 sugirió una metástasis idéntica en los dos grupos, solo los ratones sin exposición previa presentaron una señal medible el día 7 en adelante, lo que sugiere una respuesta de memoria anti-glioma de eliminación rápida y eficaz ahora independiente de citocinas proinflamatorias expresadas ectópicamente.

Ejemplo 4: Los CTL son las principales células efectoras del rechazo de glioma mediado por IL-12Fc.

Está bien establecido que la IL-12 polariza los linfocitos T sin exposición previa para adoptar un fenotipo de T_H1 (Trinchieri, Nat Rev Immunol 3, 133-146 (2003)). Para arrojar más luz a los fundamentos mecánicos que subyacen al rechazo inducido por IL-12 de glioma experimental, los presentes inventores expusieron ratones deficientes en la citocina IFN- γ distintiva de T_H1 (*lfng*^{-/-}) con células GI261 que expresan IL-12Fc (Fig. 6A). Los animales se trataron tal como se describe en la Fig. 3/ Ejemplo 1. Para su sorpresa, los presentes inventores observaron un rechazo tumoral similar al de animales de ts, lo que sugiere que el mecanismo de rechazo es independiente de IFN- γ . Por el contrario, IL-12 también estimula la actividad citotóxica de los CTL. Cuando los presentes inventores analizaron el papel de la perforina, una molécula citolítica expresada principalmente en los CTL CD8⁺ y en células NK, los presentes inventores observaron una clara diferencia en las curvas de supervivencia. (Fig. 6B). La perforina es una molécula citolítica que se expresa principalmente por los CTL CD8⁺ y por las células NK, pero también por los linfocitos T CD4⁺. Para investigar adicionalmente el mecanismo de rechazo de glioma inducido por IL-12Fc, se expusieron ratones deficientes en perforina (*prfr1*^{-/-}) con células GI261 que expresan IL-12Fc. Al contrario de *lfng*^{-/-}, los animales deficientes en perforina (*prfr1*^{-/-}) no fueron capaces de controlar el tumor. Esto sostiene la noción de que los CTL son las principales células efectoras del rechazo de glioma mediado por IL-12Fc. Se observó una clara diferencia en las curvas de supervivencia del ts y de *prf1*^{-/-}.

Ejemplo 5: La administración local de IL-12Fc en combinación con el bloqueo sistémico de CTLA-4 o PD1 es eficaz contra los gliomas experimentales de etapa avanzada.

Ejemplo de referencia:

Para reforzar adicionalmente y prolongar el fenotipo activado de los linfocitos T, los presentes inventores bloquearon la molécula coinhibidora CTLA-4 mediante anticuerpos neutralizantes en el siguiente conjunto de experimentos. La IL-12 se administró localmente a ratones con tumores en etapas avanzadas. Se administró el tratamiento a animales que se habían expuesto a GI261 Fc 21 días antes y que ya presentaban fuertes señales de bioluminiscencia, lo que indica una etapa avanzada de crecimiento de glioma. Tratamiento local: En el día 21, se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran 50 ng de IL-12Fc/día (o PBS). Tras 28 días (día 49 tras la inyección tumoral) se explantaron las bombas vacías de los animales que sobrevivieron. Tratamiento sistémico: En el día 22, los animales portadores de tumor recibieron por vía i.p. 200 μ g de IgG2b de ratón α CTLA-4 (9D9) o PBS. El tratamiento se mantuvo con 100 μ g de α CTLA-4 los días 26, 29, 35 y 42 (Fig. 7). Ni IL-12Fc ni el anti-CTLA-4 solos confirieron ninguna ventaja significativa en la supervivencia. Increíblemente, la combinación de la administración local de IL-12Fc directamente en el sitio del tumor en combinación con el bloqueo sistémico de CTLA-4 llevó a una remisión completa del tumor (Fig. 8). 90 días tras la inoculación, la evaluación histológica del tejido cerebral de los animales que sobrevivieron no mostró ningún signo de desmielinización o infiltrados.

Ejemplo:

La administración local de IL-12Fc en combinación con el bloqueo sistémico de PD-1 también llevó a un aumento significativo en los animales que sobrevivieron, la frecuencia, sin embargo, fue menor que con el bloqueo sistémico de CTLA-4 (Fig. 9). La terapia de combinación descrita anteriormente (Fig. 7) confiere una ventaja significativa en la supervivencia incluso en el caso de crecimiento intracraneal de células de melanoma murino singénico B16-F10 (Fig. 10). Este no es un modelo perfecto para tumores cerebrales secundarios dado que se salta diversas etapas de formación de metástasis. Incluso en esta situación más agresiva, el tratamiento de combinación prolonga la supervivencia.

El tratamiento preventivo de tumores en modelos preclínicos puede permitir el estudio de mecanismos inmunológicos y las interacciones entre células tumorales y el microentorno del tumor. Sin embargo, la terapia preventiva es de relevancia clínica limitada en la traducción para tratar pacientes con cáncer. Por lo tanto, los presentes inventores decidieron elegir un punto temporal excepcionalmente tardío para la intervención en un modelo de enfermedad progresiva y agresiva. Para imitar de cerca una situación clínica, los presentes inventores permitieron que el tumor progresase hasta un tamaño que es altamente probable que cause síntomas neurológicos en seres humanos. En el presente caso, la monoterapia con IL-12 aplicada localmente (intratumoral) tuvo un efecto de supervivencia mínimo aunque significativo. Los presentes inventores ya observaron un efecto sinérgico débil cuando combinaron el tratamiento sistémico de IL-12 con el bloqueo sistémico de CTLA-4. Cuando la infusión local de IL-12 se combinó con el bloqueo sistémico de CTLA-4 o PD1, el efecto anti-glioma fue sorprendente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitaet Zuerich

<120> Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibitoras de linfocitos T para terapia tumoral

<130> uz117wo

<160>9

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210>1
<211>775
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> fusión entre la IL-12 humana e IgG4 Fc

<400> 1

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

15 Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

ES 2 888 249 T3

Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	
				165					170					175		
Ala	Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	
			180					185					190			
Cys	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala	Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	
		195					200					205				
Glu	Val	Met	Val	Asp	Ala	Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	
	210					215					220					
Ser	Ser	Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	
225					230					235					240	
Leu	Gln	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	
				245					250					255		
Glu	Tyr	Pro	Asp	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Thr	
			260					265					270			
Phe	Cys	Val	Gln	Val	Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Asp	Arg	
		275					280					285				
Val	Phe	Thr	Asp	Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	
	290					295					300					
Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ser	
305					310					315					320	
Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
				325					330					335		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	
			340					345					350			
Pro	Gly	Met	Phe	Pro	Cys	Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	
		355					360					365				
Val	Ser	Asn	Met	Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Pro	
	370					375					380					
Cys	Thr	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	
385					390					395					400	
Ser	Thr	Val	Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	
				405					410					415		

ES 2 888 249 T3

Cys	Leu	Asn	Ser	Arg	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	420	425	430
Ala	Ser	Arg	Lys	Thr	Ser	Phe	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Ser	Ile	435	440	445
Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Met	Asn	Ala	450	455	460
Lys	Leu	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu	Asp	Gln	Asn	Met	465	470	475
Leu	Ala	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu	485	490	495
Thr	Val	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Phe	Tyr	Lys	Thr	500	505	510
Lys	Ile	Lys	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ile	Arg	Ala	Val	515	520	525
Thr	Ile	Asp	Arg	Val	Met	Ser	Tyr	Leu	Asn	Ala	Ser	Lys	Val	Asp	Lys	530	535	540
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	545	550	555
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	565	570	575
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	580	585	590
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	595	600	605
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	610	615	620
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	625	630	635
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	645	650	655
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	660	665	670

ES 2 888 249 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Pro Glu Glu Met Thr Lys
675 680 685

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
690 695 700

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
705 710 715 720

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
725 730 735

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
740 745 750

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
755 760 765

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
770 775

<210>2

<211>781

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> construcción de fusión de IL-12 IgG3 Fc de murino

<400> 2

ES 2 888 249 T3

Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
50 55 60

Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
85 90 95

ES 2 888 249 T3

Leu	Ser	His	Ser	His	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Ile	Trp
			100					105					110		
Ser	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Phe	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Lys	Cys
		115					120					125			
Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Ser	Trp	Leu	Val	Gln
	130					135					140				
Arg	Asn	Met	Asp	Leu	Lys	Phe	Asn	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro
145					150					155					160
Asp	Ser	Arg	Ala	Val	Thr	Cys	Gly	Met	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Glu	Lys
				165					170					175	
Val	Thr	Leu	Asp	Gln	Arg	Asp	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Ser	Val	Ser	Cys	Gln
			180					185					190		
Glu	Asp	Val	Thr	Cys	Pro	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu
		195					200					205			
Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Gln	Asn	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ser
	210					215					220				
Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu	Gln
225					230					235					240
Met	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Glu	Tyr	Pro
				245					250					255	
Asp	Ser	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Lys	Phe	Phe	Val
			260					265					270		
Arg	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Glu	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Cys
		275					280					285			
Asn	Gln	Lys	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Ser	Thr	Glu	Val	Gln
	290					295					300				
Cys	Lys	Gly	Gly	Asn	Val	Cys	Val	Gln	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Asn
305					310					315					320
Ser	Ser	Cys	Ser	Lys	Trp	Ala	Cys	Val	Pro	Cys	Arg	Val	Arg	Ser	Gly
				325					330					335	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Val
			340					345					350		

ES 2 888 249 T3

Ile	Pro	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Arg	Cys	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Asn	Leu	355	360	365	
Leu	Lys	Thr	Thr	Asp	Asp	Met	Val	Lys	Thr	Ala	Arg	Glu	Lys	Leu	Lys	370	375	380	
His	Tyr	Ser	Cys	Thr	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Arg	385	390	395	400
Asp	Gln	Thr	Ser	Thr	Leu	Lys	Thr	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	His	Lys	405	410	415	
Asn	Glu	Ser	Cys	Leu	Ala	Thr	Arg	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Arg	Gly	420	425	430	
Ser	Cys	Leu	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Met	Met	Thr	Leu	Cys	Leu	435	440	445	
Gly	Ser	Ile	Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln	Thr	Glu	Phe	Gln	Ala	450	455	460	
Ile	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	His	Asn	His	Gln	Gln	Ile	Ile	Leu	Asp	465	470	475	480
Lys	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Asn	His	485	490	495	
Asn	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Pro	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Asp	Pro	500	505	510	
Tyr	Arg	Val	Lys	Met	Lys	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Ser	Thr	515	520	525	
Arg	Val	Val	Thr	Ile	Asn	Arg	Val	Met	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Ala	Leu	530	535	540	
Ile	Lys	Arg	Ile	Glu	Pro	Arg	Ile	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	545	550	555	560
Ser	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	565	570	575	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Ala	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	580	585	590	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	His				

ES 2 888 249 T3

595					600					605					
Val	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asn	Lys	Glu	Val	His	Thr	Ala	Trp	Thr	Gln
610						615					620				
Pro	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu
625					630					635					640
Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys
				645					650					655	
Val	Asn	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys
			660					665					670		
Pro	Lys	Gly	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro
		675					680					685			
Arg	Glu	Gln	Met	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr
	690					695					700				
Asn	Phe	Phe	Ser	Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Arg	Asn	Gly	Glu
705					710					715					720
Leu	Glu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Asn	Thr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				725					730					735	
Thr	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Asp	Ser	Trp	Leu
			740					745					750		
Gln	Gly	Glu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		755					760					765			
His	His	Thr	Gln	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys			
	770					775					780				

<210>3
 <211>17
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador de PCR

<400> 3
 acacacagcc tggacgc 17

<210>4

	<211>20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 4	
10	catttgaact ccttgcccct	20
	<210>5	
	<211>219	
	<212> PRT	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	

ES 2 888 249 T3

Met	Cys	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Leu	1	5	10	15
Asp	His	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	Pro	20	25	30	
Gly	Met	Phe	Pro	Cys	Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	35	40	45	
Ser	Asn	Met	Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Pro	Cys	50	55	60	
Thr	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	Ser	65	70	75	80
Thr	Val	Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	Cys	85	90	95	
Leu	Asn	Ser	Arg	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	100	105	110	
Ser	Arg	Lys	Thr	Ser	Phe	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Ser	Ile	Tyr	115	120	125	
Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Met	Asn	Ala	Lys	130	135	140	
Leu	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu	Asp	Gln	Asn	Met	Leu	145	150	155	160
Ala	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu	Thr	165	170	175	
Val	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Phe	Tyr	Lys	Thr	Lys	180	185	190	
Ile	Lys	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ile	Arg	Ala	Val	Thr	195	200	205	
Ile	Asp	Arg	Val	Met	Ser	Tyr	Leu	Asn	Ala	Ser	210	215							

ES 2 888 249 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

5

Met	Cys	His	Gln	Gln	Leu	Val	Ile	Ser	Trp	Phe	Ser	Leu	Val	Phe	Leu
1				5					10					15	

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val	Glu	Leu	Asp	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu
		35					40					45			

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190

ES 2 888 249 T3

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

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

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210>7

<211>2328

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> construcción de expresión, secuencia codificante para la proteína de fusión IL-12 IgG4 Fc

<400> 7

ES 2 888 249 T3

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg tttttctggc atctccctc	60
gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat	120
gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg tatcacctgg	180
accttgacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa	240
gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg	300
ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttgggtcca ctgatatttt aaaggaccag	360
aaagaacca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc	420
acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga	480
ggctcttctg accccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc	540

ES 2 888 249 T3

```

agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgcccc 600
gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atgggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660
gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgacct acccaagaac 720
ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtacctgac 780
acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840
agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggcatctgc 900
cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcggggc caggaccgct actatagctc atcttgagc 960
gaatgggcat ctgtgccctg cagtggaggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 1020
ggcggatcca gaaacctccc cgtggccact ccagaccag gaatgttccc atgccttcac 1080
cactcccaaa acctgctgag ggccgtcagc aacatgctcc agaaggccag acaaactcta 1140
gaattttacc cttgcacttc tgaagagatt gatcatgaag atatcacaaa agataaaacc 1200
agcacagtgg aggcctgttt accattggaa ttaaccaaga atgagagttg cctaaattcc 1260
agagagacct ctttcataac taatgggagt tgccctggcct ccagaaagac ctcttttatg 1320
atggccctgt gccttagtag tatttatgaa gacttgaaga tgtaccaggt ggagttcaag 1380
accatgaatg caaagcttct gatggatcct aagaggcaga tctttctaga tcaaaacatg 1440
ctggcagtta ttgatgagct gatgcaggcc ctgaatttca acagtgagac tgtgccacaa 1500
aaatcctccc ttgaagaacc ggatttttat aaaactaaaa tcaagctctg catacttctt 1560
catgctttca gaattcgggc agtgactatt gatagagtga tgagctatct gaatgcttcc 1620
aaggtggaca agagagttga gtccaaatat ggtcccccac gccatcatg cccagcacct 1680
gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg ttccccccaa aaccaagga cactctcatg 1740
atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag 1800
gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1860
gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1920
tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc 1980
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc 2040
ccatccccgg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 2100
taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 2160
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacgac tcttcttccc tctacagcag gctaaccgtg 2220
gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 2280
cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg gtaaatga 2328

```

<210>8

5

<211>10994

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> vector de plásmido que codifica el marcador de Fc (murino)

5

<400> 8

ctcgcagcaa agcaagatgt gtcctcagaa gctaaccatc tcctggtttg ccatcgtttt	60
gctgggtgtct ccactcatgg ccatgtggga gctggagaag cttatcaaga gaatcgagcc	120
tagaataccc aagcccagta cccccccagg ttcttcatgc ccacctggta acatcttggg	180
tggaccatcc gtcttcatct tcccccaaaa gcccaaggat gcactcatga tctccctaac	240
ccccaagggtt acgtgtgtgg tgggtggatgt gagcgaggat gaccagatg tccatgtcag	300
ctggtttgtg gacaacaaag aagtacacac agcctggacg cagccccgtg aagctcagta	360
caacagtacc ttccgagtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact ggatgagggg	420
caaggagttc aaatgcaagg tcaacaacaa agccctccca gcccccatcg agagaacat	480
ctcaaaaccc aaaggaagag ccagacacc tcaagtatac accatacccc cacctcgtga	540
acaaatgtcc aagaagaagg ttagtctgac ctgcctggtc accaacttct tctctgaagc	600
catcagtgtg gagtgggaaa ggaacggaga actggagcag gattacaaga aactccacc	660
catcctggac tcggatggga cctacttctt ctacagcaag ctactgtgg atacagacag	720
ttggttgcaa ggagaaatth ttacctgctc cgtgggtgcat gaggctctcc ataaccacca	780
cacacagaag aacctgtctc gctcccctgg taaatgagaa cagcatctag cggccgctcg	840
aggccggcaa ggccggatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca	900
actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth	960
gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgtth	1020
caggttcagg gggaggtgtg ggaggtthtt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt	1080
atggctgatt atgatccggc tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac	1140
acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag	1200
cccgtcaggc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgagg tcgactctag	1260
aggatcgatg ccccgccccg gacgaactaa acctgactac gacatctctg ccccttcttc	1320
gcggggcagt gcatgtaatc ccttcagttg gttggtacaa cttgccaaact gggccctgth	1380
ccacatgtga cacggggggg gaccaaacac aaaggggttc tctgactgta gttgacatcc	1440
ttataaatgg atgtgcacat ttgccaaacac tgagtggctt tcatcctgga gcagactthg	1500
cagtctgtgg actgcaacac aacattgcct ttatgtgtaa ctcttggtg aagctcttac	1560
accaatgctg ggggacatgt acctcccagg gggccaggaa gactacggga ggctacacca	1620
acgtcaatca gaggggcctg tgtagctacc gataagcggg ccctcaagag ggcattagca	1680

ES 2 888 249 T3

atagtgttta	taaggccccc	ttgttaaccc	taaacgggta	gcatatgctt	cccgggtagt	1740
agtatatact	atccagacta	accctaattc	aatagcatat	gttaccacaac	gggaagcata	1800
tgctatcgaa	ttagggttag	taaaagggtc	ctaaggaaca	gcgatatctc	ccaccccatg	1860
agctgtcacg	gttttattta	catgggggtca	ggattccacg	agggtagtga	accatttttag	1920
tcacaagggc	agtggctgaa	gatcaaggag	cgggcagtga	actctcctga	atcttcgcct	1980
gcttcttcat	tctccttcgt	ttagctaata	gaataactgc	tgagttgtga	acagtaaggt	2040
gtatgtgagg	tgctcgaaaa	caaggtttca	ggtgacgccc	ccagaataaa	atttggaagg	2100
gggggttcagt	gggtggcattg	tgctatgaca	ccaatataac	cctcacaaac	cccttgggca	2160
ataaataacta	gtgtaggaat	gaaacattct	gaatatcttt	aacaatagaa	atccatgggg	2220
tggggacaag	ccgtaaagac	tggtatgtcca	tctcacacga	atttatggct	atgggcaaca	2280
cataatccta	gtgcaatatg	atactggggt	tattaagatg	tgtcccaggc	agggaccaag	2340
acaggtgaac	catgttggtta	cactctatct	gtaacaaggg	gaaagagagt	ggacgccgac	2400
agcagcggac	tccactgggt	gtctctaaca	cccccgaaaa	ttaaacgggg	ctccacgcca	2460
atggggccca	taaacaaaga	caagtggcca	ctcttttttt	tgaaattgtg	gagtgggggc	2520
acgcgtcagc	ccccacacgc	cgccctgcgg	ttttggactg	taaaataagg	gtgtaataac	2580
ttggctgatt	gtaaccccg	taaccactgc	ggtcaaacca	cttgcccaca	aaaccactaa	2640
tggcaccccg	gggaatacct	gcataagtag	gtgggcgggc	caagataggg	gcgcgattgc	2700
tgcgatctgg	aggacaaatt	acacacactt	gcgcctgagc	gccaagcaca	gggttggttg	2760
tcctcatatt	cacgaggtcg	ctgagagcac	ggtgggctaa	tggtgccatg	ggtagcatat	2820
actacccaaa	tatctggata	gcatatgcta	tcctaatacta	tatctgggta	gcataggcta	2880
tcctaatacta	tatctgggta	gcatatgcta	tcctaatacta	tatctgggta	gtatatgcta	2940
tcctaatttta	tatctgggta	gcataggcta	tcctaatacta	tatctgggta	gcatatgcta	3000
tcctaatacta	tatctgggta	gtatatgcta	tcctaatactg	tatccgggta	gcatatgcta	3060
tcctaataga	gattagggta	gtatatgcta	tcctaatttta	tatctgggta	gcatataacta	3120
cccaaataatc	tggatagcat	atgctatcct	aatctatatc	tgggtagcat	atgctatcct	3180
aatctatatc	tgggtagcat	aggctatcct	aatctatatc	tgggtagcat	atgctatcct	3240
aatctatatc	tgggtagtat	atgctatcct	aatttatatc	tgggtagcat	aggctatcct	3300
aatctatatc	tgggtagcat	atgctatcct	aatctatatc	tgggtagtat	atgctatcct	3360
aatctgtatc	cgggtagcat	atgctatcct	catgcatata	cagtcagcat	atgataccca	3420
gtagtagagt	gggagtgtga	tcctttgcat	atgcgcgcac	ctcccaaggg	ggcgtgaatt	3480
ttcgctgctt	gtccttttcc	tgctgggtgc	tccattctt	aggtgaattt	aaggaggcca	3540

ES 2 888 249 T3

ggctaaagcc	gtcgcatgtc	tgattgctca	ccaggtaa	gtcgcta	ttttcca	3600
cgagaaggtg	ttgagcgcg	agctgagtga	cgtgacaaca	tgggtatgcc	caattgcccc	3660
atgttgggag	gacgaaaatg	gtgacaagac	agatggccag	aaatacacca	acagcacgca	3720
tgatgtctac	tggggattta	ttcttttagtg	cgggggaata	cacggctttt	aatacgattg	3780
agggcgctctc	ctaacaagtt	acatcactcc	tgcccttcc	caccctcatc	tccatcacct	3840
ccttcatctc	cgtcatctcc	gtcatcacc	tccgcgccag	ccccttccac	cataggtgga	3900
aaccagggag	gcaaatctac	tccatcgtca	aagctgcaca	cagtcaccct	gatattgcag	3960
gtaggagcgg	gctttgtcat	aacaaggtcc	ttaatcgcat	ccttcaaac	ctcagcaa	4020
atatgagttt	gtaaaaagac	catgaaataa	cagacaatgg	actcccttag	cgggccaggt	4080
tgtgggccgg	gtccaggggc	cattccaaag	gggagacgac	tcaatggtgt	aagacgacat	4140
tgtggaatag	caagggcagt	tctcgcctt	aggttgtaaa	gggaggtctt	actacctcca	4200
tatacgaaca	cacggcgac	ccaagtcc	tcgtcggtag	tcctttctac	gtgactccta	4260
gccaggagag	ctcttaaacc	ttctgcaatg	ttctcaaatt	tgggttgga	acctccttga	4320
ccacgatgct	ttccaaacca	ccctcctttt	ttgcgcctgc	ctccatcacc	ctgaccocgg	4380
ggtccagtgc	ttgggccttc	tccctgggtca	tctgccccgc	cctgctctat	cgtcccggg	4440
ggcacgtcag	gctcaccatc	tgggccacct	tcttggtggt	attcaaaata	atcggttcc	4500
cctacagggg	ggaaaaatgg	ccttctacct	ggagggggcc	tgcgcggtgg	agaccgggat	4560
gatgatgact	gactactggg	actcctgggc	ctcttttctc	cacgtccacg	acctctcccc	4620
ctggctcttt	cacgacttcc	ccccctggct	ctttcacgtc	ctctaccccg	gcggcctcca	4680
ctacctcctc	gaccccggcc	tccactacct	cctcgacccc	ggcctccact	gcctcctoga	4740
ccccggcctc	caacctcctgc	tccctgccct	cctgctcctg	ccccctctcc	tgctcctgcc	4800
cctcctgccc	ctcctgctcc	tgccccctcct	gccccctcctg	ctcctgcccc	tcctgcccct	4860
cctgctcctg	ccccctcctgc	ccctcctcct	gctcctgccc	ctcctgcccc	tcctcctgct	4920
cctgccccctc	ctgccccctcc	tgctcctgcc	cctcctgccc	ctcctgctcc	tgccccctcct	4980
gccccctcctg	ctcctgcccc	tcctgctcct	gccccctcctg	ctcctgcccc	tcctgctcct	5040
gccccctcctg	ccccctcctgc	ccctcctcct	gctcctgccc	ctcctgctcc	tgccccctcct	5100
gccccctcctg	ccccctcctgc	tcctgcccct	cctcctgctc	ctgccccctcc	tgccccctcct	5160
gccccctcctc	ctgctcctgc	ccctcctgcc	cctcctcctg	ctcctgcccc	tcctcctgct	5220
cctgccccctc	ctgccccctcc	tgccccctcct	cctgctcctg	ccccctcctgc	ccctcctcct	5280
gctcctgccc	ctcctcctgc	tcctgcccct	cctgccccctc	ctgccccctcc	tcctgctcct	5340
gccccctcctc	ctgctcctgc	ccctcctgcc	cctcctgccc	ctcctgcccc	tcctcctgct	5400
cctgccccctc	ctcctgctcc	tgccccctcct	gctcctgccc	ctcccgtcc	tgctcctgct	5460

cctgttccac	cgtgggtccc	tttgcagcca	atgcaacttg	gacgtttttg	gggtctccgg	5520
acaccatctc	tatgtcttgg	ccctgatcct	gagccgcccc	gggctcctgg	tcttccgcct	5580
cctcgtcctc	gtcctcttcc	ccgtcctcgt	ccatggttat	cacccctctc	tctttgaggt	5640
ccactgccgc	cggagccttc	tggtccagat	gtgtctccct	tctctcctag	gccatttcca	5700
ggtcctgtac	ctggccccctc	gtcagacatg	attcacacta	aaagagatca	atagacatct	5760
ttattagacg	acgctcagtg	aatacagga	gtgcagactc	ctgccccctc	caacagcccc	5820
cccaccctca	tccccttcat	ggtcgctgtc	agacagatcc	aggtctgaaa	attccccatc	5880
ctccgaacca	tcctcgtcct	catcaccaat	tactcgcagc	ccggaaaact	cccgtgaac	5940
atcctcaaga	tttgcgtcct	gagcctcaag	ccaggcctca	aattcctcgt	cccccttttt	6000
gctggacggt	agggatgggg	attctcggga	cccctcctct	tcctcttcaa	ggtcaccaga	6060
cagagatgct	actggggcaa	cggaagaaaa	gctgggtgcg	gcctgtgagg	atcagcttat	6120
cgatgataag	ctgtcaaaca	tgagaattct	tgaagacgaa	agggcctcgt	gatacgccta	6180
tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	gtttcttaga	cgtcaggtgg	cacttttcgg	6240
ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	6300
ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	6360
attcaacatt	tcctgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	6420
gctcaccag	aaacgctgg	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	6480
ggttacatcg	aactggatct	caacagcgg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	6540
cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccgtgtt	6600
gacgccgggc	aagagcaact	cggtcgccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	6660
tactcaccag	tcacagaaaa	gcattctacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	6720
gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	6780
ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgcacaac	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	6840
tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgca	6900
gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaa	tacttactct	agcttcccgg	6960
caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	7020
cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	7080
atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagtatt	ctacacgacg	7140
gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgcctcactg	7200
attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tactttagat	tgatttaaaa	7260
cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgaccaaa	7320

ES 2 888 249 T3

atcccttaac	gtgagttttc	gttcactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	7380
tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	7440
ctaccagcgg	tggtttggtt	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	7500
ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	7560
cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaatacct	gttaccagtg	7620
gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	7680
gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcga	7740
acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	7800
gaaggagaaa	agggcgacag	gtatccggtg	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	7860
aggagcttc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	ctgtcgggtt	tcgccacctc	7920
tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	7980
agcaacgcgg	cctttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	cttgaagctg	tccctgatgg	8040
tcgtcatcta	cctgcctgga	cagcatggcc	tgcaacgcgg	gcatcccgat	gccgcgggaa	8100
gcgagaagaa	tcataatggg	gaaggccatc	cagcctcgcg	tcgcgaacgc	cagcaagacg	8160
tagcccagcg	cgtcggcccc	gagatgcgcc	gcgtgcggct	gctggagatg	gcggacgcga	8220
tggatatgtt	ctgccaaggg	ttggtttgcg	cattcacagt	tctccgcaag	aattgattgg	8280
ctccaattct	tggagtgggtg	aatccgttag	cgaggtgccg	ccctgcttca	tccccgtggc	8340
ccgttgctcg	cgtttgctgg	cgggtgtccc	ggaagaaata	tatttgcatg	tctttagttc	8400
tatgatgaca	caaaccccg	ccagcgtctt	gtcattggcg	aattcgaaca	cgcagatgca	8460
gtcggggcgg	cgcgggtccg	ggtccacttc	gcatattaag	gtgacgcgtg	tggcctcgaa	8520
caccgagcga	ccctgcagcg	accgccttaa	cagcgtcaac	agcgtgccgc	agatcccggg	8580
gggcaatgag	atatgaaaaa	gcctgaactc	accgcgacgt	ctgtcgagaa	gtttctgatc	8640
gaaaagtctg	acagcgtctc	cgacctgatg	cagctctcgg	agggcgaaga	atctcgtgct	8700
ttcagcttcg	atgtaggagg	gcgtggatat	gtcctgcggg	taaatagctg	cgccgatgg	8760
ttctacaaag	atcgttatgt	ttatcggcac	tttgcatcgg	ccgcgctccc	gattccggaa	8820
gtgcttgaca	ttggggaatt	cagcgagagc	ctgacctatt	gcatctccc	ccgtgcacag	8880
ggtgtcacgt	tgcaagacct	gcctgaaacc	gaactgccc	ctgttctgca	gccggtcgcg	8940
gaggccatgg	atgcgatcgc	tgcgggccgat	cttagccaga	cagcggggtt	cggcccattc	9000
ggaccgcaag	gaatcgggtca	atacactaca	tggcgtgatt	tcatatgcgc	gattgctgat	9060
ccccatgtgt	atcactggca	aactgtgatg	gacgacaccg	tcagtgcgtc	cgtcgcgcag	9120
gctctcgatg	agctgatgct	ttgggcccag	gactgcccc	aagtccggca	cctcgtgcac	9180
gcggatttctg	gtccaacaa	tgtcctgacg	gacaatggcc	gcataacagc	ggtcattgac	9240

tggagcgagg	cgatgttcgg	ggattcccaa	tacgaggtcg	ccaacatctt	cttctggagg	9300
ccgtgggttg	cttgtatgga	gcagcagacg	cgctacttcg	agcggaggca	tccggagctt	9360
gcaggatcgc	cgcggtccg	ggcgtatatg	ctccgcattg	gtcttgacca	actctatcag	9420
agcttggttg	acggcaatth	cgatgatgca	gcttggggcg	agggtcgatg	cgacgcaatc	9480
gtccgatccg	gagccgggac	tgtcggggcg	acacaaatcg	cccgcagaag	cgcgggccg	9540
tggaccgatg	gctgtgtaga	agtactcgcc	gatagtggaa	accgacgccc	cagcactcgt	9600
ccggatcggg	agatggggga	ggctaactga	aacacggaag	gagacaatac	cggaaggaa	9660
ccgcgctatg	acggcaataa	aaagacagaa	taaaacgcac	gggtgttggg	tcgthttgtc	9720
ataaacgcgg	ggttcggtcc	cagggtcgcc	actctgtcga	tacccacccg	agaccccat	9780
ggggccaata	cgcccgcgth	tcttccttht	ccccacccca	cccccaagt	tgggtgaag	9840
gcccagggct	cgagcccaac	gtcggggggg	caggccctgc	catagccact	ggccccgtg	9900
gttagggacg	gggtcccca	tggggaatgg	tttatggthc	gtgggggtta	ttatthtggg	9960
cgttgcggtg	ggtcaggtcc	acgaactggc	tgagcagaca	gacccatggt	thttggatgg	10020
cctgggcatg	gaccgcatgt	actggcgcca	cacgaacacc	ggcggtctgt	ggctgcctaa	10080
cacccccgac	ccccaaaaac	caccgcggcg	atthctggcg	tgccaagcta	gtcgaccaat	10140
tctcatgtht	gacagcttat	catcgagat	ccgggcaacg	ttgttgccat	tgctgcaggc	10200
gcagaactgg	taggtatgga	agatctatac	attgaatcaa	tattggcaat	tagccatatt	10260
agtcattggt	tatatagcat	aatcaatat	tggctattgg	ccattgcata	cgttgthtct	10320
atatcataat	atgtacatth	atattggctc	atgtccaata	tgaccgccat	gttgacattg	10380
attattgact	agthattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagthcata	gcccataat	10440
ggagthccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgcc	ggctgaccgc	ccaacgaccc	10500
ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	ggactthtcca	10560
ttgacgtcaa	tgggtggagt	atthacggta	aactgcccac	ttggcagtac	atcaagtgt	10620
tcatatgcca	agtcggcccc	ctattgacgt	caatgacgg	aatggcccc	cctggcatta	10680
tgcccagtac	atgaccttac	gggaactthc	tacttggcag	tacatctacg	tattagthcat	10740
cgtattacc	atggtgatgc	ggtthtggca	gtacaccaat	ggcggtggat	agcggthtga	10800
ctcacgggga	thtccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagthtgt	thtggcacca	10860
aatcaacgg	gactthtcaa	aatgtogtaa	taaccccgcc	ccgttgacgc	aatggggcg	10920
taggcgtgta	cgggtggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	gtcagatctc	10980
tagaagctgg	gtac					10994

<210>9

<211>12539
<212> ADN
<213> artificial

- 5 <220>
 <223> vector de plásmido que codifica la construcción de fusión Fc-marcador IL-12

 <400> 9

gtacctcgca gcaaagcaag atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg	60
ttttgctgggt gtctccactc atggccatgt gggagctgga gaaagacggt tatgttgtag	120
aggtggactg gactcccgat gccctggag aaacagtga cctcacctgt gacacgctg	180
aagaagatga catcacctgg acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga	240
ccctgaccat cactgtcaaa gagtttctag atgctggcca gtacacctgc caciaaggag	300
gogagactct gagccactca catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggtcca	360
ctgaaatddd aaaaaatttc aaaaacaaga ctttcctgaa gtgtgaagca ccaaattact	420
ccggacgggt cactgtctca tggctgggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca	480
agagcagtag cagttccctt gactctcggt cagtgcacatg tggaatggcg tctctgtctg	540
cagagaaggt cactctggac caaagggtact atgagaagta ttcagtgtcc tggcaggagg	600
atgtcacctg cccaactgcc gaggagacct tggccattga actggcggtg gaagcacggc	660
agcagaataa atatgagaac tacagcacca gcttcttcat caggacatc atcaaaccag	720
acccgcccaa gaacttgtag atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg	780
agtacctga ctctggagc actccctatt cctacttctc cctcaagttc tttgttcgaa	840
tccagcgcaa gaaagaaaag atgaaggaga cagaggagggt gtgtaaccag aaaggtgcgt	900
tcctcgtaga gaagacatct accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag	960
ctcaggatcg ctattacaat tcctcgtaga gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc	1020
gatccggagg cgggtggctg ggcgggtggg ggtcggtggg cggcggtacc agggctattc	1080
cagtctctgg acctgccagg tgtcttagcc agtcccgaaa cctgctgaag accacagatg	1140
acatggtgaa gacggccaga gaaaaactga aacattattc ctgcactgct gaagacatcg	1200
atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta cactggaaac	1260
tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta gagagacttc ttccacaaca agagggtgct	1320
gcctgcccc acagaagacg tctttgatga tgacctgtg ccttggtagc atctatgagg	1380
acttgaagat gtaccagaca gagttccagg ccatcaacgc agcacttcag aatcacaacc	1440
atcagcagat cattctagac aagggtatgc tgggtggcat cgatgagctg atgcagtctc	1500
tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca gacccttaca	1560
gagtgaatat gaagctctgc atctgtctc acgccttcag caccgcgtc gtgaccatca	1620
acagggtgat gggctatctg agctccgctt tgatcaagag aatcgagcct agaataccca	1680

agcccagtag	ccccccaggt	tcttcatgcc	cacctggtaa	catcttgggt	ggaccatccg	1740
tcttcatctt	ccccccaaag	cccaaggatg	cactcatgat	ctccctaacc	cccaaggtta	1800
cgtgtgtggt	ggtggatgtg	agcgaggatg	accagatgt	ccatgtcagc	tggtttgtgg	1860
acaacaaaga	agtacacaca	gcctggacgc	agccccgtga	agctcagtag	aacagtacct	1920
tccgagtggg	cagtgccttc	cccatccagc	accaggactg	gatgaggggc	aaggagttca	1980
aatgcaaggt	caacaacaaa	gcctcccag	cccccatcga	gagaaccatc	tcaaaaccca	2040
aaggaagagc	ccagacacct	caagtataca	ccataccccc	acctcgtgaa	caaagtgtcc	2100
agaagaaggt	tagtctgacc	tgcttgggtc	ccaacttctt	ctctgaagcc	atcagtgtgg	2160
agtgggaaag	gaacggagaa	ctggagcagg	attacaagaa	cactccacc	atcctggact	2220
cggatgggac	ctacttcttc	tacagcaagc	tactgtgga	tacagacagt	tggttgcaag	2280
gagaaatttt	tacctgcttc	gtggtgcatg	aggctctcca	taaccaccac	acacagaaga	2340
acctgtctcg	ctccctgggt	aaatgagaac	agcatctagc	ggccgctcga	ggccggcaag	2400
gccggatcca	gacatgataa	gatacattga	tgagtttggg	caaaccacaa	ctagaatgca	2460
gtgaaaaaaaa	tgctttattt	gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatttg	taaccattat	2520
aagctgcaat	aaacaagtta	acaacaacaa	ttgcattcat	tttatgtttc	aggttcaggg	2580
ggaggtgtgg	gaggtttttt	aaagcaagta	aaacctctac	aaatgtggta	tggttgatta	2640
tgatccggct	gcctcgcgcg	tttcggtgat	gacggtgaaa	acctctgaca	catgcagctc	2700
ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaagcg	gatgccggga	gcagacaagc	ccgtcaggcg	2760
tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggcgca	gccatgaggt	cgactctaga	ggatcgatgc	2820
cccgccccgg	acgaactaaa	cctgactacg	acatctctgc	cccttcttcg	cggggcagtg	2880
catgtaatcc	cttcagttgg	ttggtacaac	ttgccaactg	ggccctgttc	cacatgtgac	2940
acgggggggg	acaaaacaca	aaggggttct	ctgactgtag	ttgacatcct	tataaatgga	3000
tgtgcacatt	tgccaacact	gagtggcttt	catcctggag	cagactttgc	agtctgtgga	3060
ctgcaacaca	acattgcctt	tatgtgtaac	tcttggtgga	agctcttaca	ccaatgctgg	3120
gggacatgta	cctcccaggg	gccaggaag	actacgggag	gctacaccaa	cgtcaatcag	3180
aggggcctgt	gtagctaccg	ataagcggac	cctcaagagg	gcattagcaa	tagtgtttat	3240
aaggccccct	tgtaaacctt	aaacgggtag	catatgcttc	ccgggtagta	gtatatacta	3300
tccagactaa	ccctaattca	atagcatatg	ttacccaacg	ggaagcatat	gctatcgaat	3360
tagggtagt	aaaagggtcc	taaggaacag	cgatatctcc	caccccatga	gctgtcacgg	3420
ttttattttac	atgggggtcag	gattccacga	gggtagtgaa	ccatttttagt	cacaagggca	3480
gtggctgaag	atcaaggagc	gggcagtga	ctctcctgaa	tcttcgcctg	cttcttcatt	3540

ctccttcggt	tagctaatag	aataactgct	gagttgtgaa	cagtaagggtg	tatgtgaggt	3600
gctcgaaaac	aaggtttcag	gtgacgcccc	cagaataaaa	tttggacggg	gggttcagtg	3660
gtggcattgt	gctatgacac	caatataacc	ctcacaaacc	ccttgggcaa	taaatactag	3720
tgtaggaatg	aaacattctg	aatatcttta	acaatagaaa	tccatggggg	ggggacaagc	3780
cgtaaagact	ggatgtccat	ctcacacgaa	tttatggcta	tgggcaacac	ataatcctag	3840
tgcaatatga	tactgggggt	attaagatgt	gtcccaggca	gggaccaaga	caggtgaacc	3900
atgttggtac	actctatttg	taacaagggg	aaagagagtg	gacgccgaca	gcagcggact	3960
ccactggttg	tctctaacac	ccccgaaaat	taaacggggc	tccacgcaa	tggggcccat	4020
aaacaaagac	aagtggccac	tctttttttt	gaaattgtgg	agtgggggca	cgcgtcagcc	4080
cccacacgcc	gccctgcggt	tttggactgt	aaaataaggg	tgtataaact	tggctgattg	4140
taaccccgct	aaccactgcg	gtcaaaccac	ttgcccacaa	aaccactaat	ggcaccgccg	4200
ggaataacctg	cataagtagg	tgggcggggc	aagatagggg	cgcgattgct	gcgatctgga	4260
ggacaaatta	cacacacttg	cgctgagcg	ccaagcacag	ggttggttgg	cctcatattc	4320
acgaggtcgc	tgagagcacg	gtgggcta	gttgccatgg	gtagcatata	ctacccaaat	4380
atctggatag	catatgctat	cctaacttat	atctgggtag	cataggctat	cctaacttat	4440
atctgggtag	catatgctat	cctaacttat	atctgggtag	tatatgctat	cctaatttat	4500
atctgggtag	cataggctat	cctaacttat	atctgggtag	catatgctat	cctaacttat	4560
atctgggtag	tatatgctat	cctaacttat	atccgggtag	catatgctat	cctaacttat	4620
attagggtag	tatatgctat	cctaatttat	atctgggtag	catatactac	ccaaatatct	4680
ggatagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	4740
gggtagcata	ggctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	4800
gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	ggctatccta	atctatatct	4860
gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgctatccta	atctgtatcc	4920
gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgataccag	tagtagagtg	4980
ggagtgcctat	cctttgcata	tgccgccacc	tccaagggg	gcgtgaattt	tcgctgcttg	5040
tccttttctc	gctggttgct	cccattctta	ggtgaattta	aggaggccag	gctaaagccg	5100
tcgcatgtct	gattgctcac	caggtaaatg	tcgctaattg	tttccaacgc	gagaagggtg	5160
tgagcgcgga	gctgagtgac	gtgacaacat	gggtatgccc	aattgcccc	tgttgggagg	5220
acgaaaatgg	tgacaagaca	gatggccaga	aatacaccaa	cagcacgcat	gatgtctact	5280
ggggatttat	tcttttagtg	gggggaatac	acggctttta	atacgattga	gggcgtctcc	5340
taacaagtta	catcactcct	gcccttcctc	accctcatct	ccatcacctc	cttcactctcc	5400
gtcatctccg	tcataccctc	ccgcggcagc	cccttcacc	ataggtggaa	accagggagg	5460

caaatctact	ccatcgtcaa	agctgcacac	agtcaccctg	atattgcagg	taggagcggg	5520
ctttgtcata	acaaggtcct	taatcgcatc	cttcaaaacc	tcagcaaata	tatgagtttg	5580
taaaaagacc	atgaaataac	agacaatgga	ctcccttagc	gggccagggt	gtgggccggg	5640
tccagggggc	attccaaagg	ggagacgact	caatggtgta	agacgacatt	gtggaatagc	5700
aagggcagtt	cctcgcctta	ggttgtaaag	ggaggcttta	ctacctccat	atacgaacac	5760
accggcgacc	caagttcctt	cgtcggtagt	cctttctacg	tgactcctag	ccaggagagc	5820
tcttaaaccct	tctgcaatgt	tctcaaatit	cggtttggaa	cctccttgac	cacgatgctt	5880
tccaaaccac	cctccttttt	tgcgcctgcc	tccatcacco	tgaccccggg	gtccagtgct	5940
tgggccttct	cctgggtcat	ctgcggggcc	ctgctctatc	gctcccgggg	gcacgtcagg	6000
ctcaccatct	gggccacctt	cttgggtgga	ttcaaaataa	tgggttccc	ctacagggtg	6060
gaaaaatggc	cttctacctg	gagggggcct	gcgcggtgga	gaccgggatg	atgatgactg	6120
actactggga	ctcctgggac	tctttttctc	acgtccacga	cctctccccc	tggctctttc	6180
acgacttccc	cccttggtct	tttcaagctc	tctaccccg	cggtctccac	tacctcctcg	6240
accccggcct	ccactacctc	ctcgaccccg	gcctccactg	cctcctcgac	ccgggcctcc	6300
acctcctgct	cctgcccctc	ctgctcctgc	ccctcctcct	gctcctgccc	ctcctgcccc	6360
tctgctcct	gcccctcctg	ccctcctgc	tctgcccct	cctgcccctc	ctgctcctgc	6420
ccctcctgac	cctcctcctg	ctcctgcccc	tctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	6480
tgcccctcct	gctcctgccc	ctcctgcccc	tctgctcct	gcccctcctg	ccctcctgc	6540
tctgcccct	cctgctcctg	ccctcctgc	tctgcccct	cctgctcctg	ccctcctgc	6600
ccctcctgac	cctcctcctg	ctcctgcccc	tctgctcct	gcccctcctg	ccctcctgc	6660
ccctcctgct	cctgcccctc	ctcctgctcc	tgcccctcct	gcccctcctg	ccctcctcc	6720
tgctcctgac	cctcctgccc	ctcctcctgc	tctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	6780
tgcccctcct	gcccctcctc	ctgctcctgc	ccctcctgac	cctcctcctg	ctcctgcccc	6840
tctcctgct	cctgcccctc	ctgcccctcc	tgcccctcct	cctgctcctg	ccctcctcc	6900
tgctcctgac	cctcctgccc	ctcctgcccc	tctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	6960
tctgctcct	gcccctcctg	ctcctgcccc	tcccgtcct	gctcctgctc	ctgttccacc	7020
gtgggtccct	ttgcagccaa	tgcgaacttg	acgttttttg	ggtctccgga	caccatctct	7080
atgtcttggc	cctgatcctg	agcgcgcggg	ggctcctggt	cttcgcgcctc	ctcgtcctcg	7140
tctcttccc	cgtcctcgtc	catgggttct	acccctcttt	ctttgaggtc	cactgccgcc	7200
ggagccttct	ggtccagatg	tgtctccctt	ctctcctagg	ccatttccag	gtcctgtacc	7260
tggcccctcg	tcagacatga	ttcacactaa	aagagatcaa	tagacatctt	tattagacga	7320

cgctcagtga	atacagggag	tgcagactcc	tgccccctcc	aacagcccc	ccaccctcat	7380
ccccttcatg	gtcgtgtca	gacagatcca	ggtctgaaaa	ttcccatcc	tccgaaccat	7440
cctcgtcctc	atcaccaatt	actcgcagcc	cggaaaaactc	ccgctgaaca	tcctcaagat	7500
ttgcgtcctg	agcctcaagc	caggcctcaa	attcctcgtc	cccctttttg	ctggacggta	7560
gggatgggga	ttctcgggac	ccctcctctt	cctcttcaag	gtcaccagac	agagatgcta	7620
ctggggcaac	ggaagaaaag	ctgggtgcgg	cctgtgagga	tcagcttata	gatgataagc	7680
tgtcaaacat	gagaattctt	gaagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	ttttataggt	7740
taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	7800
cggaaaccct	atttgtttat	ttttctaaat	acattcaaata	atgtatccgc	tcatagaca	7860
ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	7920
ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgccgc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccaga	7980
aacgctggtg	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	8040
actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	8100
gatgagcact	tttaaagtcc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccggttg	acgccgggca	8160
agagcaactc	ggtcgcgcga	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	8220
cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	8280
catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	8340
aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcgtt	gggaaccgga	8400
gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgcag	caatggcaac	8460
aacgttgccg	aaactattaa	ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	8520
agactggatg	gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgcctggccc	ttccggctgg	8580
ctggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	8640
actggggcca	gatggttaagc	cctcccgtat	cgtagttata	tacacgacgg	ggagtccaggc	8700
aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	8760
gtaactgtca	gaccaagttt	actcatatat	acttttagatt	gattttaaac	ttcattttta	8820
atttaaaagg	atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	tcctttaacg	8880
tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	8940
tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcgg	9000
ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	9060
agcgcagata	ccaaatactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	9120
ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgtctc	gctaactcctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	9180
tggcgataag	togtgtctta	ccgggttgga	ctcaagaoga	tagttaccgg	ataaggcgca	9240

gcgggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	9300
cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcgcc	acgcttcccg	aaggagaaaa	9360
ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggg	cggaacagga	gagcgcacga	gggagcttcc	9420
agggggaaaac	gcctggtatc	tttatagtc	tgctgggttt	cgccacctct	gacttgagcg	9480
tcgatttttg	tgatgctcgt	cagggggggc	gagcctatgg	aaaaacgcca	gcaacgcggc	9540
ctttttacgg	ttcctggcct	tttgctggcc	ttgaagctgt	ccctgatggg	cgtcatctac	9600
ctgcctggac	agcatggcct	gcaacgcggg	catcccgatg	ccgccggaag	cgagaagaat	9660
cataatgggg	aaggccatcc	agcctcgctg	cggaacggcc	agcaagacgt	agcccagcgc	9720
gtcggccccc	agatgcgccc	cgtgcggctg	ctggagatgg	cggacgcgat	ggatatgttc	9780
tgccaagggg	tggtttgccg	attcacagtt	ctccgcaaga	attgattggc	tccaattctt	9840
ggagtgggtga	atccgttagc	gaggtgccgc	cctgcttcat	cccgtggcc	cgttgctcgc	9900
gtttgctggc	ggtgtccccg	gaagaaatat	atttgcattg	ctttagttct	atgatgacac	9960
aaacccccgc	cagcgtcttg	tcattggcga	attcgaacac	gcagatgcag	tcggggcggc	10020
gcgggtccgag	gtccacttcg	catattaagg	tgacgcgtgt	ggcctcgaac	accgagcgac	10080
cctgcagcga	cccgttaaac	agcgtcaaca	gcgtgccgca	gatccccggg	ggcaatgaga	10140
tatgaaaaag	cctgaactca	cgcgcagctc	tgctcgagaag	tttctgatcg	aaaagttcga	10200
cagcgtctcc	gacctgatgc	agctctcgga	gggcgaagaa	tctcgtgctt	tcagcttcga	10260
tgtaggaggg	cgtggatatg	tcctgcgggt	aaatagctgc	gccgatgggt	tctacaaaga	10320
tcgttatgtt	tatcggcact	ttgcatcggc	cgcgtccccg	attccggaag	tgcttgacat	10380
tggggaattc	agcgagagcc	tgacctattg	catctcccgc	cgtgcacagg	gtgtcacgtt	10440
gcaagacctg	cctgaaaccg	aactgcccgc	tggtctgcag	ccggtcgcgg	aggccatgga	10500
tgcgatcgct	gcggccgatc	ttagccagac	gagcgggttc	ggcccattcg	gaccgcaagg	10560
aatcgggtcaa	tacactacat	ggcgtgattt	catatgcgcg	attgctgatc	cccatgtgta	10620
tcactggcaa	actgtgatgg	acgacaccgt	cagtgcgtcc	gtcgcgcagg	ctctcgatga	10680
gctgatgctt	tgggccgagg	actgccccga	agtccggcac	ctcgtgcacg	cggatttcgg	10740
ctccaacaat	gtcctgacgg	acaatggccg	cataacagcg	gtcattgact	ggagcgaggc	10800
gatgttcggg	gattcccaat	acgaggtcgc	caacatcttc	ttctggaggc	cgtggttggc	10860
ttgtatggag	cagcagacgc	gctacttcga	gcggaggcat	ccggagcttg	caggatcgcc	10920
gcggctccgg	gcgtatatgc	tcgcattggg	tcttgaccaa	ctctatcaga	gcttggttga	10980
cggaatttc	gatgatgcag	cttggggcga	gggtcgatgc	gacgcaatcg	tccgatccgg	11040
agccgggact	gtcgggcgta	cacaaatcgc	ccgcagaagc	gcggccgtct	ggaccgatgg	11100

ctgtgtagaa	gtactcgccg	atagtggaaa	ccgacgcccc	agcactcgtc	cggatcggga	11160
gatgggggag	gctaactgaa	acacggaagg	agacaatacc	ggaaggaacc	cgcgctatga	11220
cggcaataaa	aagacagaat	aaaacgcacg	ggtgttggtt	cgtttgttca	taaacgcggg	11280
gttcggtccc	agggctggca	ctctgtcgat	accccaccga	gaccccatg	gggccaatac	11340
gcccgcgttt	cttccttttc	cccacccac	cccccaagtt	cgggtgaagg	cccagggtc	11400
gcagccaacg	tccggggcggc	aggccctgcc	atagccactg	gcccctggg	ttagggacgg	11460
ggtcccccat	ggggaatggt	ttatggttcg	tgggggttat	tattttgggc	gttgctggg	11520
gtcaggtcca	cgactggact	gagcagacag	acccatggtt	tttgatggc	ctgggcattg	11580
accgcatgta	ctggcgcgac	acgaacaccg	ggcgtctgtg	gctgccaaac	accccgacc	11640
cccaaaaacc	accgcgcgga	ttctggcgt	gccaaagctag	tcgaccaatt	ctcatgtttg	11700
acagcttatc	atcgagatc	cgggcaacgt	tgttgccatt	gctgcaggcg	cagaactggt	11760
aggtatggaa	gatctataca	ttgaatcaat	attggcaatt	agccatatta	gtcattggtt	11820
atatagcata	aatcaatatt	ggctattggc	cattgcatac	gttgatatcta	tatcataata	11880
tgtacattta	tattggctca	tgtccaatat	gaccgccatg	ttgacattga	ttattgacta	11940
gttattaata	gtaatcaatt	acggggtcat	tagttcatag	cccatatatg	gagttccgcg	12000
ttacataact	tacggtaaat	ggccgcctg	gctgaccgcc	caacgacccc	cgcccatgga	12060
cgtcaataat	gacgtatggt	cccatagtaa	cgccaatagg	gactttccat	tgacgtcaat	12120
gggtggagta	tttacggtaa	actgccact	tggcagtaca	tcaagtgtat	catatgccaa	12180
gtccgcccc	tattgacgtc	aatgacggta	aatggccgc	ctggcattat	gccagttaca	12240
tgaccttacg	ggactttcct	acttggcagt	acatctacgt	attagtcato	gctattacca	12300
tgggtgatgcg	gttttggcag	tacaccaatg	ggcgtggata	gcggtttgac	tcacggggat	12360
ttccaagtct	ccacccatt	gacgtcaatg	ggagtttgtt	ttggcaacca	aatcaacggg	12420
actttccaaa	atgtcgtaat	aacccgccc	cgttgacgca	aatggcggt	aggcgtgtac	12480
ggtgggaggt	ctatataagc	agagctcgtt	tagtgaaccg	tcagatctct	agaagctgg	12539

LISTADO DE SECUENCIAS

- | | |
|----|--|
| 5 | <110> Universitaet Zuerich |
| | <120> Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibidoras de linfocitos T para terapia tumoral |
| 10 | <130> uz117wo |
| | <160>9 |
| | <170> PatentIn versión 3.5 |
| 15 | <210>1 |
| | <211>775 |
| | <212> PRT |
| | <213> artificial |

ES 2 888 249 T3

<220>

<223> fusión entre la IL-12 humana e IgG4 Fc

<400> 1

5

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

ES 2 888 249 T3

Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	
				165					170					175		
Ala	Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	
			180					185					190			
Cys	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala	Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	
		195					200					205				
Glu	Val	Met	Val	Asp	Ala	Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	
	210					215					220					
Ser	Ser	Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	
225					230					235					240	
Leu	Gln	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	
				245					250					255		
Glu	Tyr	Pro	Asp	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Thr	
			260					265					270			
Phe	Cys	Val	Gln	Val	Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Asp	Arg	
		275					280					285				
Val	Phe	Thr	Asp	Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	
	290					295					300					
Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ser	
305					310					315					320	
Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
				325					330					335		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	
			340					345					350			
Pro	Gly	Met	Phe	Pro	Cys	Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	
		355					360					365				
Val	Ser	Asn	Met	Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Pro	
	370					375					380					
Cys	Thr	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	
385					390					395					400	
Ser	Thr	Val	Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	
				405					410					415		

ES 2 888 249 T3

Cys	Leu	Asn	Ser	Arg	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	420	425	430
Ala	Ser	Arg	Lys	Thr	Ser	Phe	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Ser	Ile	435	440	445
Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Met	Asn	Ala	450	455	460
Lys	Leu	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu	Asp	Gln	Asn	Met	465	470	475
Leu	Ala	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu	485	490	495
Thr	Val	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Phe	Tyr	Lys	Thr	500	505	510
Lys	Ile	Lys	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ile	Arg	Ala	Val	515	520	525
Thr	Ile	Asp	Arg	Val	Met	Ser	Tyr	Leu	Asn	Ala	Ser	Lys	Val	Asp	Lys	530	535	540
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	545	550	555
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	565	570	575
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	580	585	590
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	595	600	605
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	610	615	620
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	625	630	635
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	645	650	655
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	660	665	670

ES 2 888 249 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Pro Glu Glu Met Thr Lys
675 680 685

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
690 695 700

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
705 710 715 720

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
725 730 735

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
740 745 750

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
755 760 765

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
770 775

<210>2

<211>781

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> construcción de fusión de IL-12 IgG3 Fc de murino

<400> 2

ES 2 888 249 T3

Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
50 55 60

Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
85 90 95

ES 2 888 249 T3

Leu	Ser	His	Ser	His	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Ile	Trp
			100					105					110		
Ser	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Phe	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Lys	Cys
		115					120					125			
Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Ser	Trp	Leu	Val	Gln
	130					135					140				
Arg	Asn	Met	Asp	Leu	Lys	Phe	Asn	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro
145					150					155					160
Asp	Ser	Arg	Ala	Val	Thr	Cys	Gly	Met	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Glu	Lys
				165					170					175	
Val	Thr	Leu	Asp	Gln	Arg	Asp	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Ser	Val	Ser	Cys	Gln
			180					185					190		
Glu	Asp	Val	Thr	Cys	Pro	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu
		195					200					205			
Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Gln	Asn	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ser
	210					215					220				
Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu	Gln
225					230					235					240
Met	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Glu	Tyr	Pro
				245					250					255	
Asp	Ser	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Lys	Phe	Phe	Val
			260					265					270		
Arg	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Glu	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Glu	Glu	Gly	Cys
		275					280					285			
Asn	Gln	Lys	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Ser	Thr	Glu	Val	Gln
	290					295					300				
Cys	Lys	Gly	Gly	Asn	Val	Cys	Val	Gln	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Asn
305					310					315					320
Ser	Ser	Cys	Ser	Lys	Trp	Ala	Cys	Val	Pro	Cys	Arg	Val	Arg	Ser	Gly
				325					330					335	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Val
			340					345					350		

ES 2 888 249 T3

Ile	Pro	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Arg	Cys	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Asn	Leu	355	360	365	
Leu	Lys	Thr	Thr	Asp	Asp	Met	Val	Lys	Thr	Ala	Arg	Glu	Lys	Leu	Lys	370	375	380	
His	Tyr	Ser	Cys	Thr	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Arg	385	390	395	400
Asp	Gln	Thr	Ser	Thr	Leu	Lys	Thr	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	His	Lys	405	410	415	
Asn	Glu	Ser	Cys	Leu	Ala	Thr	Arg	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Arg	Gly	420	425	430	
Ser	Cys	Leu	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Met	Met	Thr	Leu	Cys	Leu	435	440	445	
Gly	Ser	Ile	Tyr	Glu	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln	Thr	Glu	Phe	Gln	Ala	450	455	460	
Ile	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	His	Asn	His	Gln	Gln	Ile	Ile	Leu	Asp	465	470	475	480
Lys	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Asn	His	485	490	495	
Asn	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Pro	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Asp	Pro	500	505	510	
Tyr	Arg	Val	Lys	Met	Lys	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Ser	Thr	515	520	525	
Arg	Val	Val	Thr	Ile	Asn	Arg	Val	Met	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Ala	Leu	530	535	540	
Ile	Lys	Arg	Ile	Glu	Pro	Arg	Ile	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	545	550	555	560
Ser	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	565	570	575	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Ala	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	580	585	590	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	His				

ES 2 888 249 T3

595					600					605					
Val	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asn	Lys	Glu	Val	His	Thr	Ala	Trp	Thr	Gln
610						615					620				
Pro	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu
625					630					635					640
Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys
				645					650					655	
Val	Asn	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys
			660					665					670		
Pro	Lys	Gly	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro
		675					680					685			
Arg	Glu	Gln	Met	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr
	690					695					700				
Asn	Phe	Phe	Ser	Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Arg	Asn	Gly	Glu
705					710					715					720
Leu	Glu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Asn	Thr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				725					730					735	
Thr	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Asp	Ser	Trp	Leu
			740					745					750		
Gln	Gly	Glu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		755					760					765			
His	His	Thr	Gln	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys			
	770					775					780				

<210>3
 <211>17
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador de PCR

<400> 3
 acacacagcc tggacgc 17

<210>4

	<211>20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 4	
10	catttgaact ccttgcccct	20
	<210>5	
	<211>219	
	<212> PRT	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	

Met 1	Cys	Pro	Ala	Arg 5	Ser	Leu	Leu	Leu	Val 10	Ala	Thr	Leu	Val	Leu 15	Leu
Asp	His	Leu	Ser 20	Leu	Ala	Arg	Asn 25	Leu	Pro	Val	Ala	Thr 30	Pro	Asp	Pro
Gly	Met 35	Phe	Pro	Cys	Leu	His	His 40	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu 45	Arg	Ala	Val
Ser 50	Asn	Met	Leu	Gln	Lys	Ala 55	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu 60	Phe	Tyr	Pro	Cys
Thr 65	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp 70	His	Glu	Asp	Ile	Thr 75	Lys	Asp	Lys	Thr	Ser 80
Thr	Val	Glu	Ala	Cys 85	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu 90	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser 95	Cys
Leu	Asn	Ser	Arg 100	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile 105	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys 110	Leu	Ala
Ser	Arg	Lys 115	Thr	Ser	Phe	Met	Met 120	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser 125	Ser	Ile	Tyr
Glu 130	Asp	Leu	Lys	Met	Tyr	Gln 135	Val	Glu	Phe	Lys	Thr 140	Met	Asn	Ala	Lys
Leu 145	Leu	Met	Asp	Pro	Lys 150	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu 155	Asp	Gln	Asn	Met	Leu 160
Ala	Val	Ile	Asp	Glu 165	Leu	Met	Gln	Ala	Leu 170	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu 175	Thr
Val	Pro	Gln	Lys 180	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu 185	Pro	Asp	Phe	Tyr	Lys 190	Thr	Lys
Ile	Lys	Leu 195	Cys	Ile	Leu	Leu	His 200	Ala	Phe	Arg	Ile	Arg 205	Ala	Val	Thr
Ile 210	Asp	Arg	Val	Met	Ser	Tyr 215	Leu	Asn	Ala	Ser					

ES 2 888 249 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

5

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

ES 2 888 249 T3

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

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

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210>7

<211>2328

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> construcción de expresión, secuencia codificante para la proteína de fusión IL-12 IgG4 Fc

<400> 7

ES 2 888 249 T3

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg tttttctggc atctccctc	60
gtggccatat ggggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat	120
gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg tatcacctgg	180
accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa	240
gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg	300
ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttgggtcca ctgatatttt aaaggaccag	360
aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc	420
acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga	480
ggctcttctg accccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc	540

ES 2 888 249 T3

agaggggaca	acaaggagta	tgagtactca	gtggagtgcc	aggaggacag	tgcctgcccc	600
gctgctgagg	agagtctgcc	cattgaggtc	atggtggatg	ccgttcacaa	gctcaagtat	660
gaaaactaca	ccagcagctt	cttcatcagg	gacatcatca	aacctgacct	acccaagaac	720
ttgcagctga	agccattaaa	gaattctcgg	caggtggagg	tcagctggga	gtaccttgac	780
acctggagta	ctccacattc	ctacttctcc	ctgacattct	gcgttcaggt	ccagggcaag	840
agcaagagag	aaaagaaaga	tagagtcttc	acggacaaga	cctcagccac	ggcatctctc	900
cgcaaaaatg	ccagcattag	cgtgcggggc	caggaccgct	actatagctc	atcttgagac	960
gaatgggcat	ctgtgccctg	cagtggaggc	ggtggctcgg	gcggtgggtg	gtcgggtggc	1020
ggcggatcca	gaaacctccc	cgtggccact	ccagaccag	gaatgttccc	atgccttcac	1080
cactcccaaa	acctgctgag	ggccgtcagc	aacatgctcc	agaaggccag	acaaactcta	1140
gaattttacc	cttgcacttc	tgaagagatt	gatcatgaag	atatcacaaa	agataaaacc	1200
agcacagtgg	aggcctgttt	accattggaa	ttaaccaaga	atgagagttg	cctaaattcc	1260
agagagacct	ctttcataac	taatgggagt	tgccctggct	ccagaaagac	ctcttttatg	1320
atggccctgt	gccttagtag	tatttatgaa	gacttgaaga	tgtaccaggt	ggagttcaag	1380
accatgaatg	caaagcttct	gatggatcct	aagaggcaga	tctttctaga	tcaaaacatg	1440
ctggcagtta	ttgatgagct	gatgcaggcc	ctgaatttca	acagtgagac	tgtgccacaa	1500
aaatcctccc	ttgaagaacc	ggatttttat	aaaactaaaa	tcaagctctg	catacttctt	1560
catgctttca	gaattcgggc	agtgactatt	gatagagtga	tgagctatct	gaatgcttcc	1620
aaggtggaca	agagagttga	gtccaaatat	ggtcccccat	gccatcatg	cccagcacct	1680
gagttcctgg	ggggaccatc	agtcttcctg	ttccccccaa	aaccaagga	cactctcatg	1740
atctcccggg	cccctgaggt	cacgtgcgtg	gtggtggacg	tgagccagga	agaccccgag	1800
gtccagttca	actggtacgt	ggatggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgg	1860
gaggagcagt	tcaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	1920
tggctgaacg	gcaaggagta	caagtgcaag	gtctccaaca	aaggcctccc	gtcctccatc	1980
gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagagc	cacaggtgta	caccctgccc	2040
ccatccccgg	aggagatgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggcttc	2100
taccccgagc	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	2160
accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcag	gctaaccgtg	2220
gacaagagca	ggtggcagga	ggggaatgtc	ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctg	2280
cacaaccact	acacacagaa	gagcctctcc	ctgtctctgg	gtaaatga		2328

<210>8

5

<211>10994

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> vector de plásmido que codifica el marcador de Fc (murino)

5

<400> 8

ctcgcagcaa agcaagatgt gtcctcagaa gctaaccatc tcctggtttg ccatcgtttt	60
gctgggtgtct ccactcatgg ccatgtggga gctggagaag cttatcaaga gaatcgagcc	120
tagaataccc aagcccagta cccccccagg ttcttcatgc ccacctggta acatcttggg	180
tggaccatcc gtcttcatct tcccccaaa gcccaaggat gcactcatga tctccctaac	240
ccccaagggtt acgtgtgtgg tgggtggatgt gagcgaggat gaccagatg tccatgtcag	300
ctggtttgtg gacaacaaag aagtacacac agcctggacg cagccccgtg aagctcagta	360
caacagtacc ttccgagtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact ggatgagggg	420
caaggagttc aaatgcaagg tcaacaacaa agccctccca gcccccatcg agagaacat	480
ctcaaaaccc aaaggaagag ccagacacc tcaagtatac accatacccc cacctcgtga	540
acaaatgtcc aagaagaagg ttagtctgac ctgcctggtc accaacttct tctctgaagc	600
catcagtgtg gagtgggaaa ggaacggaga actggagcag gattacaaga aactccacc	660
catcctggac tcggatggga cctacttctt ctacagcaag ctactgtgg atacagacag	720
ttggttgcaa ggagaaatth ttacctgctc cgtgggtgcat gaggctctcc ataaccacca	780
cacacagaag aacctgtctc gctcccctgg taaatgagaa cagcatctag cggccgctcg	840
aggccggcaa ggccggatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca	900
actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth	960
gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgtth	1020
caggttcagg gggaggtgtg ggaggtthtt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt	1080
atggctgatt atgatccggc tgcctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac	1140
acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag	1200
cccgtcaggc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgagg tcgactctag	1260
aggatcgatg ccccgccccg gacgaactaa acctgactac gacatctctg ccccttcttc	1320
gcggggcagt gcatgtaatc ccttcagttg gttgggtacaa cttgccaaact gggccctgth	1380
ccacatgtga cacggggggg gaccaaacac aaaggggttc tctgactgta gttgacatcc	1440
ttataaatgg atgtgcacat ttgccaaacac tgagtggctt tcatcctgga gcagactthg	1500
cagtctgtgg actgcaacac aacattgcct ttatgtgtaa ctcttggctg aagctcttac	1560
accaatgctg ggggacatgt acctcccagg gggccaggaa gactacggga ggctacacca	1620
acgtcaatca gaggggcctg tgtagctacc gataagcggg ccctcaagag ggcattagca	1680

ES 2 888 249 T3

atagtgttta	taaggccccc	ttgttaaccc	taaacgggta	gcatatgctt	cccgggtagt	1740
agtatatact	atccagacta	accctaattc	aatagcatat	gttaccacaac	gggaagcata	1800
tgctatcgaa	ttagggttag	taaaagggtc	ctaaggaaca	gcgatatctc	ccaccccatg	1860
agctgtcacg	gttttattta	catgggggtca	ggattccacg	agggtagtga	accatttttag	1920
tcacaagggc	agtggctgaa	gatcaaggag	cgggcagtga	actctcctga	atcttcgcct	1980
gcttcttcat	tctccttcgt	ttagctaata	gaataactgc	tgagttgtga	acagtaaggt	2040
gtatgtgagg	tgctcgaaaa	caaggtttca	ggtgacgccc	ccagaataaa	atttgacggg	2100
ggggttcagt	ggtggcattg	tgctatgaca	ccaatataac	cctcacaaac	cccttgggca	2160
ataaatacta	gtgtaggaat	gaaacattct	gaatatcttt	aacaatagaa	atccatgggg	2220
tggggacaag	ccgtaaagac	tggatgtcca	tctcacacga	atttatggct	atgggcaaca	2280
cataatccta	gtgcaatatg	atactggggt	tattaagatg	tgtcccaggc	agggaccaag	2340
acaggtgaac	catgttggtt	cactctatct	gtaacaaggg	gaaagagagt	ggacgccgac	2400
agcagcggac	tccactgggt	gtctctaaca	ccccgaaaa	ttaaacgggg	ctccacgcca	2460
atggggccca	taaacaaaga	caagtggcca	ctcttttttt	tgaaattgtg	gagtgggggc	2520
acgcgtcagc	ccccacacgc	cgcctgcgg	ttttggactg	taaaataagg	gtgtaataac	2580
ttggctgatt	gtaaccccg	taaccactgc	ggtcaaacca	cttgcccaca	aaaccactaa	2640
tggcaccctg	gggaatacct	gcataagtag	gtgggcgggc	caagataggg	gcgcgattgc	2700
tgcgatctgg	aggacaaatt	acacacactt	gcgcctgagc	gccaagcaca	gggttggttg	2760
tcctcatatt	cacgaggtcg	ctgagagcac	ggtgggctaa	tgttgccatg	ggtagcatat	2820
actacccaaa	tatctggata	gcatatgcta	tcctaatacta	tatctgggta	gcataggcta	2880
tcctaatacta	tatctgggta	gcatatgcta	tcctaatacta	tatctgggta	gtatatgcta	2940
tcctaatttta	tatctgggta	gcataggcta	tcctaatacta	tatctgggta	gcatatgcta	3000
tcctaatacta	tatctgggta	gtatatgcta	tcctaatactg	tatccgggta	gcatatgcta	3060
tcctaataga	gattagggta	gtatatgcta	tcctaatttta	tatctgggta	gcatatacta	3120
cccaaatact	tggatagcat	atgctatcct	aatctatatc	tgggtagcat	atgctatcct	3180
aatctatatc	tgggtagcat	aggctatcct	aatctatatc	tgggtagcat	atgctatcct	3240
aatctatatc	tgggtagtat	atgctatcct	aatttatatc	tgggtagcat	aggctatcct	3300
aatctatatc	tgggtagcat	atgctatcct	aatctatatc	tgggtagtat	atgctatcct	3360
aatctgtatc	cgggtagcat	atgctatcct	catgcatata	cagtcagcat	atgataccca	3420
gtagtagagt	gggagtgtga	tcctttgcat	atgcgcgcac	ctcccaaggg	ggcgtgaatt	3480
ttcgctgctt	gtccttttcc	tgctgggtgc	tccattctt	aggtgaattt	aaggaggcca	3540

ggctaaagcc	gtcgcatgtc	tgattgctca	ccaggtaa	atg	gtcgcta	atg	ttttcca	acg	3600
cgagaaggtg	ttgagcgcg	agctgagtg	cg	tgacaaca	tg	gggatg	gcc	caattgcccc	3660
atgttgggag	gacgaaaatg	gtgacaagac	agatggccag	aaatacacca	acagcacgca				3720
tgatgtctac	tggggattta	ttcttttagtg	cg	ggggaata	cacggctttt	aatacgattg			3780
agggcgctctc	ctaacaagtt	acatcactcc	tg	cccttcc	caccctcatc	tccatcacct			3840
ccttcatctc	cgtcatctcc	gtcatcacc	tccg	cgccag	ccccttccac	cataggtgga			3900
aaccagggag	gcaa	atctac	tccatcg	tca	aagctgcaca	cagtcaccct	gatattgcag		3960
gtaggagcgg	gctttgtcat	aacaaggtcc	ttaatcg	cat	ccttcaaac	ctcagcaa	at		4020
atatgagttt	gtaaaaagac	catgaaataa	cagacaatgg	actcccttag	cg	ggccaggt			4080
tgtgggcccgg	gtccaggggc	cattccaaag	gggagacgac	tcaatgggtgt	aagacgacat				4140
tgtggaatag	caagggcag	tccctcg	cctt	aggttgtaaa	gggaggtctt	actacctcca			4200
tatacgaaca	cacggcgac	ccaagttcct	tcgtcggtag	tcctttctac	gtgactccta				4260
gccaggagag	ctcttaaacc	ttctgcaatg	ttctcaaatt	tcgggttgga	acctccttga				4320
ccacgatgct	ttccaaacca	ccctcctttt	ttgcgcctgc	ctccatcacc	ctgaccccg				4380
ggtccagtgc	ttgggccttc	tcctgggtca	tctgcggggc	cctgctctat	cgctcccggg				4440
ggcacgtcag	gctcaccatc	tgggcccac	ct	tgtgtgtgt	attcaaaata	atcggttcc			4500
cctacagggg	ggaaaaatgg	ccttctac	ct	ggagggggcc	tg	cgcggtgg	agacccggat		4560
gatgatgact	gactactggg	actcctgggc	ctcttttctc	cacgtccacg	acctctcccc				4620
ctggctcttt	cacgacttcc	ccccctggct	ctttcacgtc	ctctaccccg	gcggcctcca				4680
ctacctcctc	gaccccg	gcc	tccactac	ct	ctgacccc	ggcctccact	gcctcctoga		4740
ccccggcctc	caacctcctgc	tcctgcccct	cctgctcctg	cccctcctcc	tgctcctgcc				4800
cctcctgccc	ctcctgctcc	tgcccctcct	gcccctcctg	ctcctgcccc	tcctgcccct				4860
cctgctcctg	cccctcctgc	ccctcctcct	gctcctgccc	ctcctgcccc	tcctcctgct				4920
cctgcccctc	ctgcccctcc	tgctcctgcc	cctcctgccc	ctcctgctcc	tgcccctcct				4980
gcccctcctg	ctcctgcccc	tcctgctcct	gcccctcctg	ctcctgcccc	tcctgctcct				5040
gcccctcctg	cccctcctgc	ccctcctcct	gctcctgccc	ctcctgctcc	tgcccctcct				5100
gcccctcctg	cccctcctgc	tcctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	tgcccctcct				5160
gcccctcctc	ctgctcctgc	ccctcctgcc	cctcctcctg	ctcctgcccc	tcctcctgct				5220
cctgcccctc	ctgcccctcc	tgcccctcct	cctgctcctg	cccctcctgc	ccctcctcct				5280
gctcctgccc	ctcctcctgc	tcctgcccct	cctgcccctc	ctgcccctcc	tcctgctcct				5340
gcccctcctc	ctgctcctgc	ccctcctgcc	cctcctgccc	ctcctgcccc	tcctcctgct				5400
cctgcccctc	ctcctgctcc	tgcccctcct	gctcctgccc	ctcccgtcc	tgctcctgct				5460

cctgttccac	cgtgggtccc	tttgcagcca	atgcaacttg	gacgtttttg	gggtctccgg	5520
acaccatctc	tatgtcttgg	ccctgatcct	gagccgcccc	gggctcctgg	tcttccgcct	5580
cctcgtcctc	gtcctcttcc	ccgtcctcgt	ccatggttat	cacccccctc	tctttgaggt	5640
ccactgccgc	cggagccttc	tggtccagat	gtgtctccct	tctctcctag	gccatttcca	5700
ggtcctgtac	ctggccccctc	gtcagacatg	attcacacta	aaagagatca	atagacatct	5760
ttattagacg	acgctcagtg	aatacagga	gtgcagactc	ctgccccctc	caacagcccc	5820
cccaccctca	tccccctcat	ggtcgctgtc	agacagatcc	aggtctgaaa	attccccatc	5880
ctccgaacca	tcctcgtcct	catcaccaat	tactcgcagc	ccggaaaact	cccgtgaaac	5940
atcctcaaga	tttgcgtcct	gagcctcaag	ccaggcctca	aattcctcgt	cccccttttt	6000
gctggacggt	agggatgggg	attctcggga	cccctcctct	tcctcttcaa	ggtcaccaga	6060
cagagatgct	actggggcaa	cggaagaaaa	gctgggtgcg	gcctgtgagg	atcagcttat	6120
cgatgataag	ctgtcaaaca	tgagaattct	tgaagacgaa	agggcctcgt	gatacgccta	6180
tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	gtttcttaga	cgtcaggtgg	cacttttcgg	6240
ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	6300
ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	6360
attcaacatt	tcctgtgcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	6420
gctcaccag	aaacgctggg	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgacagagtg	6480
ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	6540
cgtttttcaa	tgatgagcac	ttttaaaagt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccgtgtt	6600
gacgccgggc	aagagcaact	cggtcgccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	6660
tactcaccag	tcacagaaaa	gcattcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	6720
gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	6780
ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgcacaac	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	6840
tggaaccggg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgca	6900
gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaaac	tacttactct	agcttcccgg	6960
caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	7020
cttccggctg	gctgggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	7080
atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagttat	ctacacgacg	7140
gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgctcactg	7200
attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tactttagat	tgatttaaaa	7260
cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgaccaaa	7320

ES 2 888 249 T3

atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	7380
tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	7440
ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	7500
ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	7560
cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaatacct	gttaccagtg	7620
gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtcct	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	7680
gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcgga	7740
acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	7800
gaagggagaa	agggcgacag	gtatccggtg	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	7860
agggagcttc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	ctgtcggggt	tcgccacctc	7920
tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	7980
agcaacgcgg	cctttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	cttgaagctg	tccctgatgg	8040
tcgtcatcta	cctgcctgga	cagcatggcc	tgcaacgcgg	gcatcccgat	gccgcgggaa	8100
gcgagaagaa	tcataatggg	gaaggccatc	cagcctcgcg	tcgcgaacgc	cagcaagacg	8160
tagcccagcg	cgtcggcccc	gagatgcgcc	gcgtgcggct	gctggagatg	gcggacgcga	8220
tggatatgtt	ctgccaaggg	ttggtttgcg	cattcacagt	tctccgcaag	aattgattgg	8280
ctccaattct	tggagtgggtg	aatccgtag	cagagtgccg	ccctgcttca	tccccgtggc	8340
ccgttgctcg	cgtttgctgg	cggtgtcccc	ggaagaaata	tatttgcatg	tctttagttc	8400
tatgatgaca	caaaccccg	ccagcgtcct	gtcattggcg	aattcgaaca	cgcagatgca	8460
gtcggggcgg	cgcgggtccga	ggtccacttc	gcatattaag	gtgacgcgtg	tggcctcgaa	8520
caccgagcga	ccctgcagcg	accgccttaa	cagcgtcaac	agcgtgccgc	agatcccggg	8580
gggcaatgag	atatgaaaaa	gcctgaactc	accgcgacgt	ctgtcgagaa	gtttctgatc	8640
gaaaagtctg	acagcgtctc	cgacctgatg	cagctctcgg	agggcgaaga	atctcgtgct	8700
ttcagcttcg	atgtaggagg	gcgtggatat	gtcctgcggg	taaatagctg	cgccgatgg	8760
ttctacaaag	atcgttatgt	ttatcggcac	tttgcatcgg	ccgcgctccc	gattccggaa	8820
gtgcttgaca	ttggggaatt	cagcgagagc	ctgacctatt	gcatctccc	ccgtgcacag	8880
ggtgtcacgt	tgcaagacct	gcctgaaacc	gaactgccc	ctgttctgca	gccggtcgcg	8940
gaggccatgg	atgcgatcgc	tgcgggccgat	cttagccaga	cagcggggtt	cggcccattc	9000
ggaccgcaag	gaatcgggtca	atacactaca	tggcgtgatt	tcatatgcgc	gattgctgat	9060
ccccatgtgt	atcactggca	aactgtgatg	gacgacaccg	tcagtgcgtc	cgtcgcgcag	9120
gctctcgatg	agctgatgct	ttgggcccag	gactgcccc	aagtccggca	cctcgtgcac	9180
gcggatttcg	gtccaacaa	tgtcctgacg	gacaatggcc	gcataacagc	ggtcattgac	9240

tggagcgagg	cgatgttcgg	ggattcccaa	tacgaggtcg	ccaacatctt	cttctggagg	9300
ccgtgggttg	cttgtatgga	gcagcagacg	cgctacttcg	agcggaggca	tccggagctt	9360
gcaggatcgc	cgcggtccg	ggcgtatatg	ctccgcattg	gtcttgacca	actctatcag	9420
agcttggttg	acggcaatth	cgatgatgca	gcttggggcg	agggtcgatg	cgacgcaatc	9480
gtccgatccg	gagccgggac	tgtcggggcg	acacaaatcg	cccgcagaag	cgcgggccgtc	9540
tggaccgatg	gctgtgtaga	agtactcgcc	gatagtggaa	accgacgccc	cagcactcgt	9600
ccggatcggg	agatggggga	ggctaactga	aacacggaag	gagacaatac	cggaaggaaac	9660
ccgcgctatg	acggcaataa	aaagacagaa	taaaacgcac	gggtgttggg	tcgthttgttc	9720
ataaacgcgg	ggttcggtcc	cagggtctggc	actctgtcga	tacccacccg	agaccccat	9780
ggggccaata	cgcccgcgth	tcttccttht	ccccacccca	cccccaagt	tgggtgaag	9840
gcccagggct	cgagccaac	gtcggggggg	caggccctgc	catagccact	ggccccgtgg	9900
gttagggacg	gggtcccca	tggggaatgg	tttatggthc	gtgggggtta	ttatthtggg	9960
cgttgcgthg	ggtcaggtcc	acgaactggc	tgagcagaca	gacccatggt	thttggatgg	10020
cctgggcatg	gaccgcatgt	actggcgcca	cacgaacacc	gggcgtctgt	ggctgcctaaa	10080
cacccccgac	ccccaaaaac	caccgcgcgg	atthctggcg	tgccaagcta	gtcgaccaat	10140
tctcatgtht	gacagcttat	catcgcatat	ccgggcaacg	ttgttgccat	tgctgcaggc	10200
gcagaactgg	taggtatgga	agatctatac	attgaatcaa	tattggcaat	tagccatatt	10260
agtcattggt	tatatagcat	aatcaatat	tggctattgg	ccattgcata	cgttgthtct	10320
atatcataat	atgtacatth	atattggctc	atgtccaata	tgaccgccat	gttgacattg	10380
attattgact	agthattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagthcata	gcccataat	10440
ggagthccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgct	ggctgaccgc	ccaacgaccc	10500
ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	ggactthtcca	10560
ttgacgtcaa	tgggtggagt	atthacggta	aactgcccac	ttggcagta	atcaagtgt	10620
tcatatgcca	agtcggcccc	ctattgacgt	caatgacgg	aatggcccc	cctggcatta	10680
tgcccagtac	atgaccttac	gggaactthc	tacttggcag	tacatctacg	tattagthcat	10740
cgtattacc	atgggtgatg	ggtthtggca	gtacaccaat	gggcgtggat	agcggthtga	10800
ctcacgggga	thtccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagthtgt	thtggcacca	10860
aatcaacgg	gactthtcaa	aatgtogtaa	taaccccgcc	ccgttgacgc	aatggggcg	10920
taggcgtgta	cgggtggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	gtcagatctc	10980
tagaagctgg	gtac					10994

<210>9

<211>12539
<212> ADN
<213> artificial

- 5 <220>
 <223> vector de plásmido que codifica la construcción de fusión Fc-marcador IL-12

 <400> 9

gtacctcgca gcaaagcaag atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg	60
ttttgctgggt gtctccactc atggccatgt gggagctgga gaaagacggt tatgtttag	120
aggtggactg gactcccgat gccctggag aaacagtga cctcacctgt gacacgctg	180
aagaagatga catcacctgg acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga	240
ccctgaccat cactgtcaaa gagtttctag atgctggcca gtacacctgc cacaaggag	300
gogagactct gagccactca catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggtcca	360
ctgaaatddd aaaaaatttc aaaaacaaga ctttcctgaa gtgtgaagca ccaaattact	420
ccggacgggt cactgtctca tggctgggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca	480
agagcagtag cagttccctt gactctcggt cagtgcacatg tggaaatggcg tctctgtctg	540
cagagaaggt cactctggac caaagggtact atgagaagta ttcagtgtcc tgccaggagg	600
atgtcacctg cccaactgcc gaggagacct tgcccattga actggcggtg gaagcacggc	660
agcagaataa atatgagaac tacagcacca gcttcttcat caggacatc atcaaaccag	720
acccgcccaa gaacttgtag atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg	780
agtacctga ctctggagc actccctatt cctacttctc cctcaagttc tttgttcgaa	840
tccagcgcaa gaaagaaaag atgaaggaga cagaggagggt gtgtaaccag aaaggtgcgt	900
tcctcgtaga gaagacatct accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag	960
ctcaggatcg ctattacaat tcctcgtaga gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc	1020
gatccggagg cgggtggctg ggcgggtgggt ggtcggtggg cggcggtacc agggctattc	1080
cagtctctgg acctgccagg tgtcttagcc agtcccgaaa cctgctgaag accacagatg	1140
acatggtgaa gacggccaga gaaaaactga aacattattc ctgcactgct gaagacatcg	1200
atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta cactggaaac	1260
tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta gagagacttc ttccacaaca agagggtgct	1320
gcctgcccc acagaagacg tctttgatga tgacctgtg ccttggtagc atctatgagg	1380
acttgaagat gtaccagaca gagttccagg ccatcaacgc agcattcag aatcacaacc	1440
atcagcagat cattctagac aagggtatgc tgggtggcat cgatgagctg atgcagtctc	1500
tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca gacccttaca	1560
gagtgaatga gaagctctgc atctgtcttc acgccttcag caccgcgtc gtgaccatca	1620
acagggtgat gggctatctg agctccgcct tgatcaagag aatcgagcct agaataccca	1680

agcccagtag	ccccccaggt	tcttcatgcc	cacctggtaa	catcttgggt	ggaccatccg	1740
tcttcatctt	ccccccaaag	cccaaggatg	cactcatgat	ctccctaacc	cccaaggtta	1800
cgtgtgtggt	ggtggatgtg	agcgaggatg	accagatgt	ccatgtcagc	tggtttgtgg	1860
acaacaaaga	agtacacaca	gcctggacgc	agccccgtga	agctcagtag	aacagtacct	1920
tccgagtgg	cagtgccttc	cccatccagc	accaggactg	gatgaggggc	aaggagttca	1980
aatgcaaggt	caacaacaaa	gcctcccag	cccccatcga	gagaaccatc	tcaaaaccca	2040
aaggaagagc	ccagacacct	caagtataca	ccatacccc	acctcgtgaa	caaagtgtcc	2100
agaagaaggt	tagtctgacc	tgctgggtca	ccaacttctt	ctctgaagcc	atcagtgtgg	2160
agtgggaaag	gaacggagaa	ctggagcagg	attacaagaa	cactccacc	atcctggact	2220
cggatgggac	ctacttcttc	tacagcaagc	tactgtgga	tacagacagt	tggttgcaag	2280
gagaaatttt	tacctgcttc	gtggtgcatg	aggctctcca	taaccaccac	acacagaaga	2340
acctgtctcg	ctccctgggt	aatgagaac	agcatctagc	ggccgctcga	ggccggcaag	2400
gccggatcca	gacatgataa	gatacattga	tgagtttgg	caaaccacaa	ctagaatgca	2460
gtgaaaaaaaa	tgctttattt	gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatttg	taaccattat	2520
aagctgcaat	aaacaagtta	acaacaacaa	ttgcattcat	tttatgtttc	aggttcaggg	2580
ggaggtgtgg	gaggtttttt	aaagcaagta	aaacctctac	aatgtggta	tggttgatta	2640
tgatccggct	gcctcgcgcg	tttcggtgat	gacggtgaaa	acctctgaca	catgcagctc	2700
ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaagcg	gatgccggga	gcagacaagc	ccgtcaggcg	2760
tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggcgca	gccatgaggt	cgactctaga	ggatcgatgc	2820
cccgccccgg	acgaactaaa	cctgactacg	acatctctgc	cccttcttcg	cggggcagtg	2880
catgtaatcc	cttcagttgg	ttggtacaac	ttgccaactg	ggccctgttc	cacatgtgac	2940
acgggggggg	acaaaacaca	aaggggttct	ctgactgtag	ttgacatcct	tataaatgga	3000
tgtgcacatt	tgccaacact	gagtggcttt	catcctggag	cagactttgc	agtctgtgga	3060
ctgcaacaca	acattgcctt	tatgtgtaac	tcttggtgga	agctcttaca	ccaatgctgg	3120
gggacatgta	cctcccaggg	gccaggaag	actacgggag	gctacaccaa	cgtcaatcag	3180
aggggcctgt	gtagctaccg	ataagcggac	cctcaagagg	gcattagcaa	tagtgtttat	3240
aaggccccct	tgtaaacctt	aaacgggtag	catatgcttc	ccgggtagta	gtatatacta	3300
tccagactaa	ccctaattca	atagcatatg	ttacccaacg	ggaagcatat	gctatcgaat	3360
tagggtagt	aaaagggtcc	taaggaacag	cgatatctcc	caccccatga	gctgtcacgg	3420
ttttattttac	atgggggtcag	gattccacga	gggtagtga	ccatttttagt	cacaagggca	3480
gtggctgaag	atcaaggagc	gggcagtga	ctctcctgaa	tcttcgcctg	cttcttcatt	3540

ctccttcggt	tagctaatag	aataactgct	gagttgtgaa	cagtaagggtg	tatgtgaggt	3600
gctcgaaaac	aaggtttcag	gtgacgcccc	cagaataaaa	tttggacggg	gggttcagtg	3660
gtggcattgt	gctatgacac	caatataacc	ctcacaaacc	ccttgggcaa	taaatactag	3720
tgttaggaatg	aaacattctg	aatatcttta	acaatagaaa	tccatgggggt	ggggacaagc	3780
cgtaaagact	ggatgtccat	ctcacacgaa	tttatggcta	tgggcaacac	ataatcctag	3840
tgcaatatga	tactgggggt	attaagatgt	gtcccaggca	gggaccaaga	caggtgaacc	3900
atgttggttac	actctatttg	taacaagggg	aaagagagtg	gacgccgaca	gcagcggact	3960
ccactggttg	tctctaacac	ccccgaaaat	taaacggggc	tccacgcaa	tggggcccat	4020
aaacaaagac	aagtggccac	tctttttttt	gaaattgtgg	agtgggggca	cgcgtcagcc	4080
cccacacgcc	gccctgcggt	tttggactgt	aaaataaggg	tgtataaact	tggctgattg	4140
taaccccgct	aaccactgcg	gtcaaaccac	ttgcccacaa	aaccactaat	ggcaccgccg	4200
ggaataacctg	cataagtagg	tgggcggggc	aagatagggg	cgcgattgct	gcgatctgga	4260
ggacaaatta	cacacacttg	cgctgagcg	ccaagcacag	ggttggttgg	cctcatattc	4320
acgaggtcgc	tgagagcacg	gtgggcta	gttgccatgg	gtagcatata	ctacccaaat	4380
atctggatag	catatgctat	cctaacttat	atctgggtag	cataggctat	cctaacttat	4440
atctgggtag	catatgctat	cctaacttat	atctgggtag	tatatgctat	cctaatttat	4500
atctgggtag	cataggctat	cctaacttat	atctgggtag	catatgctat	cctaacttat	4560
atctgggtag	tatatgctat	cctaacttat	atccgggtag	catatgctat	cctaacttat	4620
attagggtag	tatatgctat	cctaatttat	atctgggtag	catatactac	ccaaatatct	4680
ggatagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	4740
gggtagcata	ggctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	4800
gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	ggctatccta	atctatatct	4860
gggtagcata	tgctatccta	atctatatct	gggtagcata	tgctatccta	atctgtatcc	4920
gggtagcata	tgctatccta	atgcatatac	agtcagcata	tgataccag	tagtagagtg	4980
ggagtgcctat	cctttgcata	tgccgccacc	tccaagggg	gcgtgaattt	tcgctgcttg	5040
tccttttctc	gctggttgct	cccattctta	ggtgaattta	aggaggccag	gctaaagccg	5100
tcgcatgtct	gattgctcac	caggtaaatg	tcgctaattg	tttccaacgc	gagaagggtg	5160
tgagcgcgga	gctgagtgc	gtgacaacat	gggtatgccc	aattgcccc	tgttgggagg	5220
acgaaaatgg	tgacaagaca	gatggccaga	aatacaccaa	cagcacgcat	gatgtctact	5280
ggggatttat	tcttttagtg	gggggaatac	acggctttta	atacgattga	gggcgtctcc	5340
taacaagtta	catcactcct	gcccctctct	accctcatct	ccatcacctc	cttcactctcc	5400
gtcatctccg	tcataccct	ccgcggcagc	cccttcacc	ataggtggaa	accagggagg	5460

caaatctact	ccatcgtcaa	agctgcacac	agtcaccctg	atattgcagg	taggagcggg	5520
ctttgtcata	acaaggtcct	taatcgcatc	cttcaaaacc	tcagcaaata	tatgagtttg	5580
taaaaagacc	atgaaataac	agacaatgga	ctcccttagc	gggccagggt	gtgggccggg	5640
tccagggggc	attccaaagg	ggagacgact	caatggtgta	agacgacatt	gtggaatagc	5700
aagggcagtt	cctcgcctta	ggttgtaaag	ggaggcttta	ctacctccat	atacgaacac	5760
accggcgacc	caagttcctt	cgtcggtagt	cctttctacg	tgactcctag	ccaggagagc	5820
tcttaaaccct	tctgcaatgt	tctcaaattt	cgggttgga	cctccttgac	cacgatgctt	5880
tccaaaccac	cctccttttt	tgcgcctgcc	tccatcacc	tgaccccg	gtccagtgt	5940
tgggccttct	cctgggtcat	ctgcggggcc	ctgctctatc	gtcccgggg	gcacgtcagg	6000
ctcaccatct	gggccacctt	cttggtggtg	ttcaaaataa	tggcttccc	ctacagggtg	6060
gaaaaatggc	cttctacctg	gagggggcct	gcgcggtgga	gaccgggatg	atgatgactg	6120
actactggga	ctcctgggac	tcttttctcc	acgtccacga	cctctcccc	tggctctttc	6180
acgacttccc	cccttggtct	tttcaagctc	tctaccccg	cggcctccac	tacctcctcg	6240
accccggcct	ccactacctc	ctcgaccccg	gcctccactg	cctcctcgac	ccgggcctcc	6300
acctcctgct	cctgcccctc	ctgctcctgc	ccctcctcct	gtcctgccc	ctcctgccc	6360
tctgtctcct	gcccctcctg	ccctcctgc	tctgcccct	cctgcccctc	ctgctcctgc	6420
ccctcctgac	cctcctcctg	ctcctgccc	tctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	6480
tgcccctcct	gtcctgccc	ctcctgccc	tctgtctcct	gcccctcctg	ccctcctgc	6540
tctgcccct	cctgtcctg	ccctcctgc	tctgcccct	cctgtcctg	ccctcctgc	6600
ccctcctgac	cctcctcctg	ctcctgccc	tctgtctcct	gcccctcctg	ccctcctgc	6660
ccctcctgct	cctgcccctc	ctcctgctcc	tgcccctcct	gcccctcctg	ccctcctcc	6720
tgtcctgac	cctcctgccc	ctcctcctgc	tctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	6780
tgcccctcct	gcccctcctc	ctgtcctgc	ccctcctgac	cctcctcctg	ctcctgccc	6840
tctcctgct	cctgcccctc	ctgcccctcc	tgcccctcct	cctgtcctg	ccctcctcc	6900
tgtcctgac	cctcctgccc	ctcctgccc	tctgcccct	cctcctgctc	ctgcccctcc	6960
tctgtctcct	gcccctcctg	ctcctgccc	tcccgtcct	gtcctgctc	ctgttccacc	7020
gtgggtccct	ttgcagccaa	tgcgaacttg	acgttttttg	ggtctccgga	caccatctct	7080
atgtcttggc	cctgatcctg	agccgcccgg	ggctcctggt	cttcgcctc	ctcgtcctcg	7140
tctcttccc	cgtcctcgtc	catgggttgc	acccctctt	ctttgaggtc	cactgccgcc	7200
ggagccttct	ggtccagatg	tgtctccctt	ctctcctagg	ccatttccag	gtcctgtacc	7260
tggcccctcg	tcagacatga	ttcacactaa	aagagatcaa	tagacatctt	tattagacga	7320

cgctcagtga	atacagggag	tgcagactcc	tgccccctcc	aacagccccc	ccaccctcat	7380
ccccttcatg	gtcgtgtca	gacagatcca	ggtctgaaaa	ttcccatcc	tccgaaccat	7440
cctcgtcctc	atcaccaatt	actcgcagcc	cggaaaaactc	ccgctgaaca	tcctcaagat	7500
ttgcgtcctg	agcctcaagc	caggcctcaa	attcctcgtc	cccctttttg	ctggacggta	7560
gggatgggga	ttctcgggac	ccctcctctt	cctcttcaag	gtcaccagac	agagatgcta	7620
ctggggcaac	ggaagaaaag	ctgggtgcgg	cctgtgagga	tcagcttata	gatgataagc	7680
tgtcaaacat	gagaattctt	gaagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	ttttataggt	7740
taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	7800
cggaaaccct	atttgtttat	ttttctaaat	acattcaaata	atgtatccgc	tcatagaca	7860
ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	7920
ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgccgc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccacga	7980
aacgctggtg	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	8040
actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	8100
gatgagcact	tttaaagtcc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccggtgtg	acgccgggca	8160
agagcaactc	ggtcgcgcga	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	8220
cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	8280
catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	8340
aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	8400
gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgcag	caatggcaac	8460
aacgttgccg	aaactattaa	ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	8520
agactggatg	gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgtcgggcc	ttccggctgg	8580
ctggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	8640
actggggcca	gatggttaagc	cctcccgtat	cgtagttata	tacacgacgg	ggagtcaggc	8700
aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	8760
gtaactgtca	gaccaagttt	actcatatat	acttttagatt	gattttaaac	ttcattttta	8820
atttaaaagg	atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	tcctttaacg	8880
tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	8940
tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	9000
ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	9060
agcgcagata	ccaaatactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	9120
ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgtctt	gctaactcctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	9180
tggcgataag	togtgtctta	ccgggttgga	ctcaagaoga	tagttaccgg	ataaggcgca	9240

gcgggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac	9300
cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagaaaa	9360
ggcggacagg tatccggtaa ggggcagggt cggaacagga gagcgacga gggagcttcc	9420
agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg	9480
tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc	9540
ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc ttgaagctgt ccctgatggg cgtcatctac	9600
ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccggaag cgagaagaat	9660
cataatgggg aaggccatcc agcctcgctg cgcgaacgcc agcaagacgt agcccagcgc	9720
gtcggccccc agatgcgccg cgtgcggctg ctggagatgg cggacgcgat ggatatgttc	9780
tgccaagggg tggtttgccg attcacagtt ctccgcaaga attgattggc tccaattctt	9840
ggagtgggga atccgttagc gaggtgccgc cctgcttcat ccccgtaggc cgttgctcgc	9900
gtttgctggc ggtgtccccg gaagaaatat atttgcattg ctttagttct atgatgacac	9960
aaacccccgc cagcgtcttg tcattggcga attcgaacac gcagatgcag tcggggcggc	10020
gcgggtccgag gtccacttcg catattaagg tgacgcgtgt ggccctcgac accgagcgac	10080
cctgcagcga cccgcttaac agcgtcaaca gcgtgccgca gatccccggg ggcaatgaga	10140
tatgaaaaag cctgaactca ccgcgacgtc tgcgagaag tttctgatcg aaaagttcga	10200
cagcgtctcc gacctgatgc agctctcgga gggcgaagaa tctcgtgctt tcagcttcga	10260
tgtaggaggg cgtggatatg tcctgcgggt aaatagctgc gccgatgggt tctacaaaga	10320
tcgttatgtt tatcggcact ttgcatcggc cgcgtccccg attccggaag tgcttgacat	10380
tggggaattc agcgagagcc tgacctattg catctccgcg cgtgcacagg gtgtcacgtt	10440
gcaagacctg cctgaaaccg aactgcccgc tgttctgcag ccggtcgcgg aggccatgga	10500
tgcgatcgct gcggccgatc ttagccagac gagcgggttc ggcccattcg gaccgcaagg	10560
aatcgggtcaa tacactacat ggcgtgattt catatgcgcg attgctgatc cccatgtgta	10620
tcactggcaa actgtgatgg acgacaccgt cagtgcgtcc gtcgcgcagg ctctcgatga	10680
gctgatgctt tgggccgagg actgccccga agtccggcac ctcgtgcacg cggatttcgg	10740
ctccaacaat gtcctgacgg acaatggccg cataacagcg gtcattgact ggagcgaggc	10800
gatgttcggg gattcccaat acgaggctgc caacatcttc ttctggaggc cgtggttggc	10860
ttgtatggag cagcagacgc gctacttcga gcggaggcat ccggagcttg caggatcgcc	10920
gcggctccgg gcgtatatgc tccgcattgg tcttgaccaa ctctatcaga gcttggttga	10980
oggcaatttc gatgatgcag cttggggcga gggtcgatgc gacgcaatcg tccgatccgg	11040
agccgggact gtcgggcgta cacaatcgc ccgcagaagc gcggccgtct ggaccgatgg	11100

ctgtgtagaa gtactcgccg atagtggaaa ccgacgcccc agcactcgtc cggatcggga	11160
gatgggggag gctaactgaa acacggaagg agacaatacc ggaaggaacc cgcgctatga	11220
cggcaataaaa aagacagaat aaaacgcacg ggtgttgggt cgtttgttca taaacgcggg	11280
gttcggtccc agggctggca ctctgtcgat accccaccga gacccattg gggccaatac	11340
gcccgcgttt ctctcttttc cccacccac cccccaagtt cgggtgaagg cccagggtc	11400
gcagccaacg tcggggcggc aggccctgcc atagccactg gcccgtggg ttagggacgg	11460
ggtcccccat gggaatggt ttatggttcg tgggggttat tattttgggc gttgctggg	11520
gtcaggtcca cgactggact gagcagacag acccatggtt tttgatggc ctgggcattg	11580
accgcatgta ctggcgcgac acgaacaccg gggtctgtg gctgccaaac accccgacc	11640
cccaaaaacc accgcgcgga tttctggcgt gccaaagctag tcgaccaatt ctcatgtttg	11700
acagcttatc atcgcagatc cgggcaacgt tgttgccatt gctgcaggcg cagaactggt	11760
aggtatggaa gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta gtcattggtt	11820
atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta tatcataata	11880
tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga ttattgacta	11940
gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg	12000
ttacataact tacggtaaatt ggccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga	12060
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat	12120
gggtggagta ttacggtaa actgccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa	12180
gtccgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgc ctggcattat gccagtaca	12240
tgaccttacg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcato gctattacca	12300
tggtgatgcg gttttggcag tacaccaatg ggcgtggata ggggtttgac tcacggggat	12360
ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaacca aatcaacggg	12420
actttccaaa atgtcgtaat aacccgccc cgttgacgca aatgggcggg aggcgtgtac	12480
ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatctct agaagctgg	12539

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento de combinación, que comprende

- un polipéptido de IL-12, o un vector de expresión de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido de IL-12, y
- un ligando no agonista seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una molécula de tipo anticuerpo, en donde dicho ligando no agonista es capaz de unirse a uno de PD-1, PD-L1 o PD-L2 con una constante de disociación de al menos 10^{-7} M^{-1} , y en donde dicho ligando no agonista se proporciona como una forma de dosificación para administración sistémica,

para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna, en donde

- dicho polipéptido de IL-12, o dicho vector de expresión de ácido nucleico, se proporcionan mediante la administración en un tumor, en las proximidades de un tumor o en el nódulo linfático asociado a un tumor.

2. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ligando no agonista es una gamma inmunoglobulina que se une a uno de PD-1, PD-L1 o PD-L2.

3. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende

- a. una secuencia de polipéptido al menos el 95 % idéntica a la secuencia de la p35 humana (SEQ ID 05), y
- b. una secuencia de polipéptido al menos el 95 % idéntica a la secuencia de la p40 humana (SEQ ID 06).

4. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende un fragmento cristalizante de inmunoglobulina G.

5. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende un fragmento cristalizante de inmunoglobulina G humana, subgrupo 4.

6. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende

- a. un fragmento cristalizante de inmunoglobulina G y una secuencia de IL-12 humana recombinante o sintética, o
- b. una secuencia al menos el 95 % idéntica al SEQ ID 01.

7. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido de IL-12, o dicho vector de expresión de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido de IL-12, se proporcionan como una forma de dosificación para inyección intratumoral.

8. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ligando no agonista se proporciona como una forma de dosificación para inyección intravenosa o para aplicación local.

9. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido de IL-12 se proporciona como una forma de dosificación para administración intratumoral o para administración local en las proximidades del tumor, y dicho ligando no agonista se proporciona como una forma de dosificación para la administración sistémica

10. Un medicamento de combinación de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en un método de terapia de glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer cerebral secundario, metástasis cerebrales, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

11. El medicamento de combinación como se define en la reivindicación 1, en donde

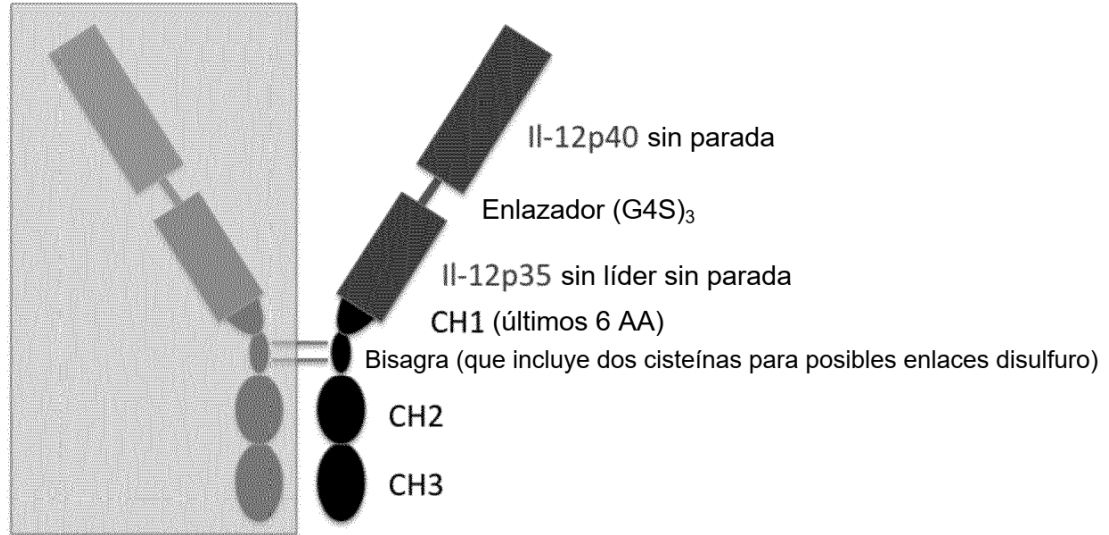
- dicho polipéptido de IL-12 es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la p40 humana, la secuencia de aminoácidos de la p35 humana y el fragmento cristalizante de la IgG4 humana,
- dicho polipéptido de IL-12 se proporciona como una forma de dosificación para administración intratumoral, y en donde
- dicho ligando no agonista es una inmunoglobulina G proporcionada como una forma de dosificación para una administración sistémica,

para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica maligna, en particular, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer cerebral secundario, metástasis cerebrales, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

- 5 12. El medicamento de combinación para su uso en la terapia de una enfermedad neoplásica maligna de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho vector de expresión de ácido nucleico es un adenovirus, un virus adenoasociado, un lentivirus o un herpesvirus.

Fig. 1

a



b

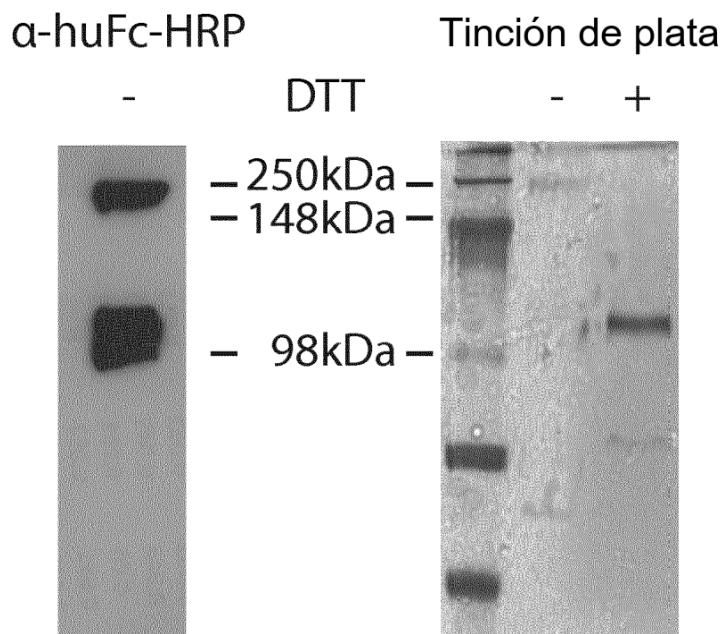


Fig. 1 c

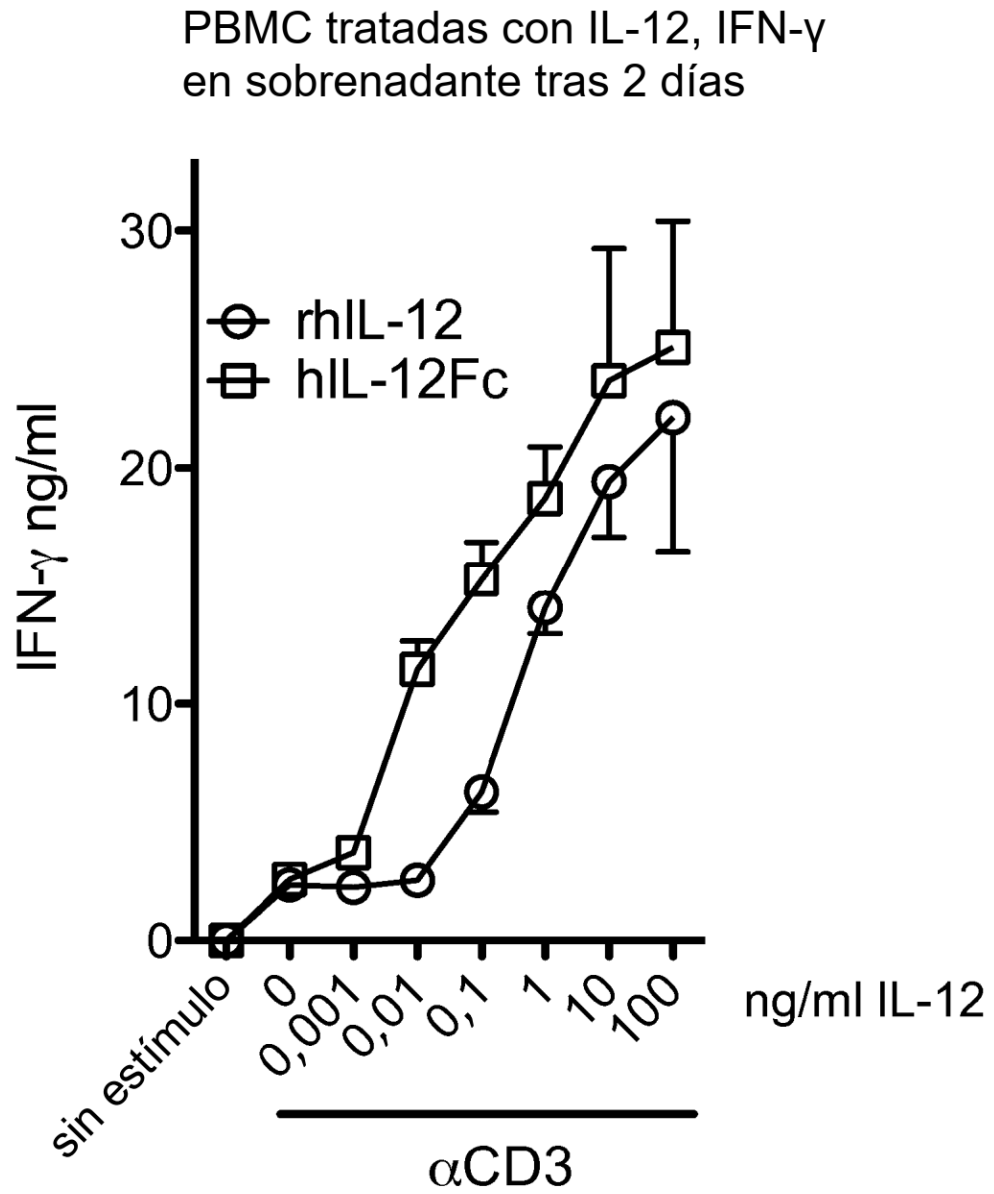


Fig. 2

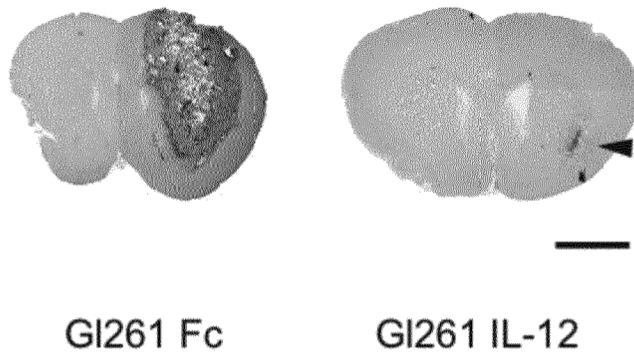


Fig. 3

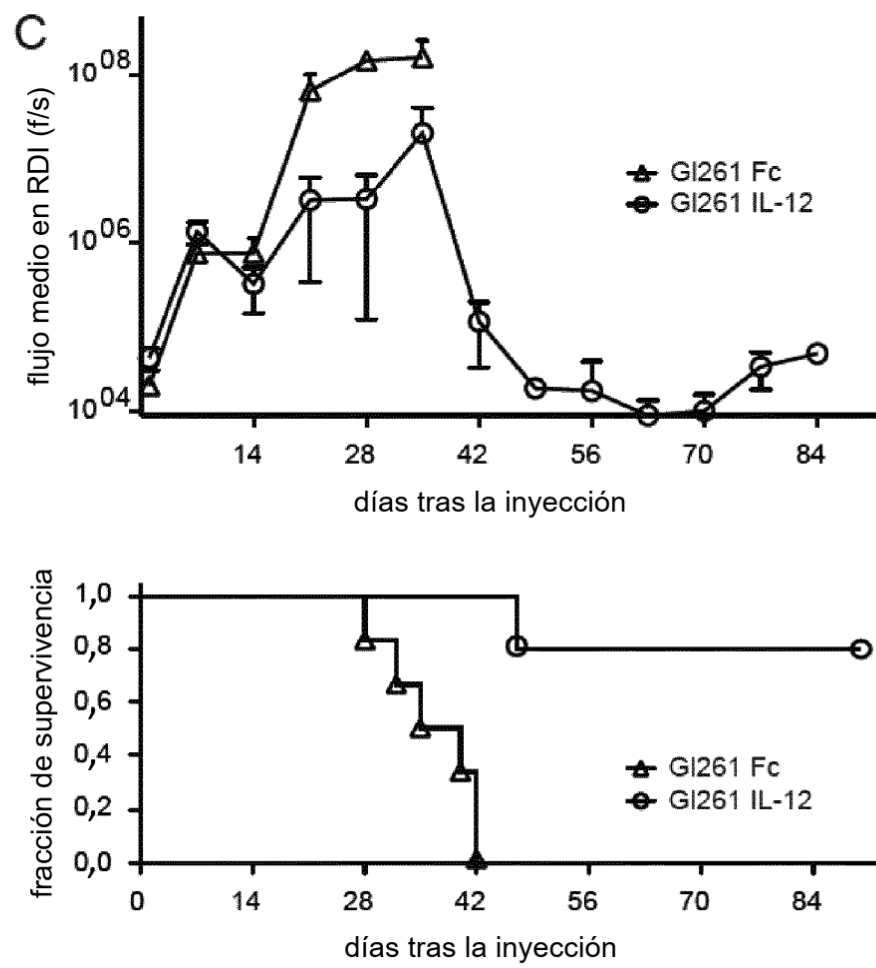


Fig. 4

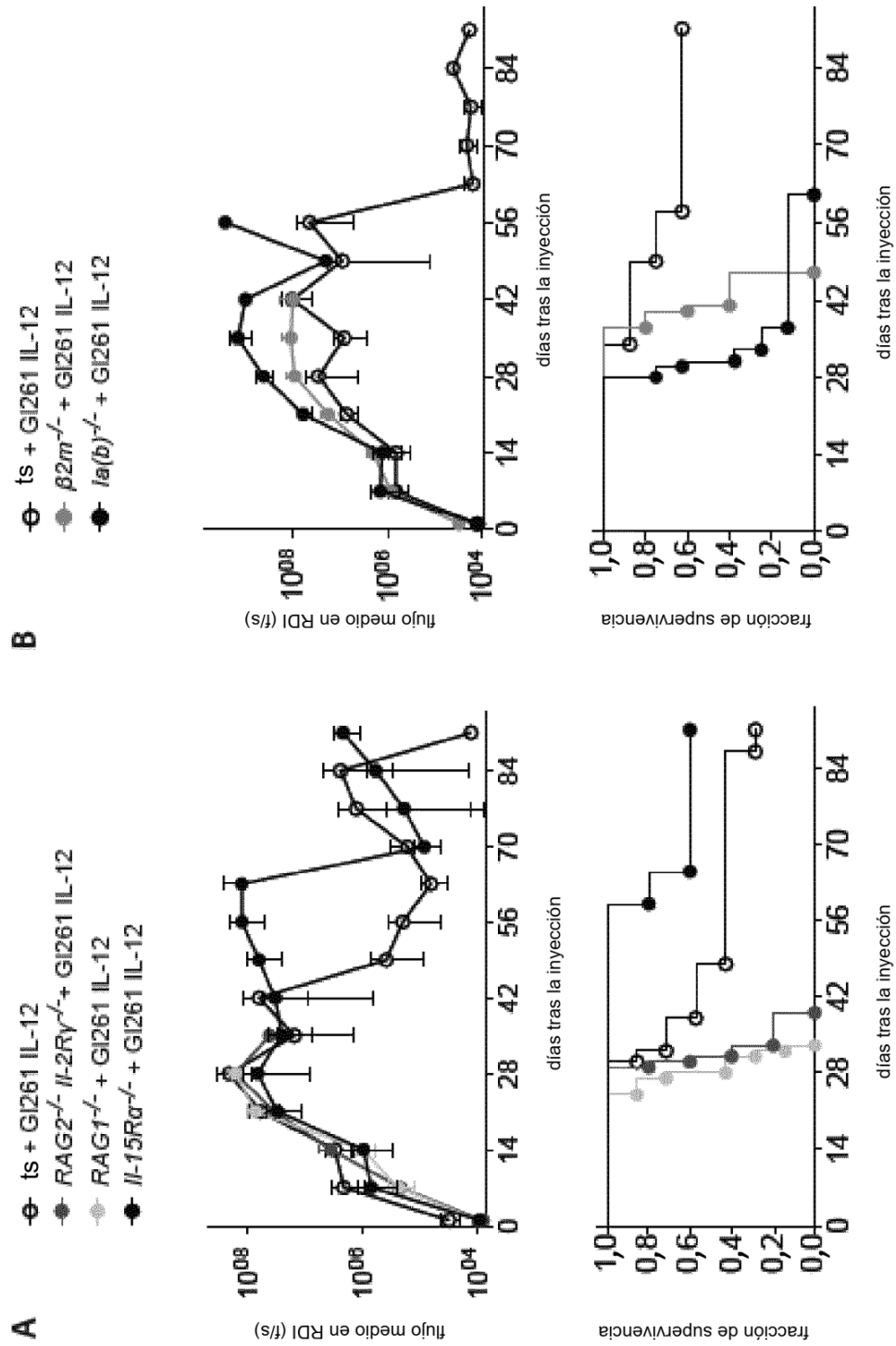


Fig. 5

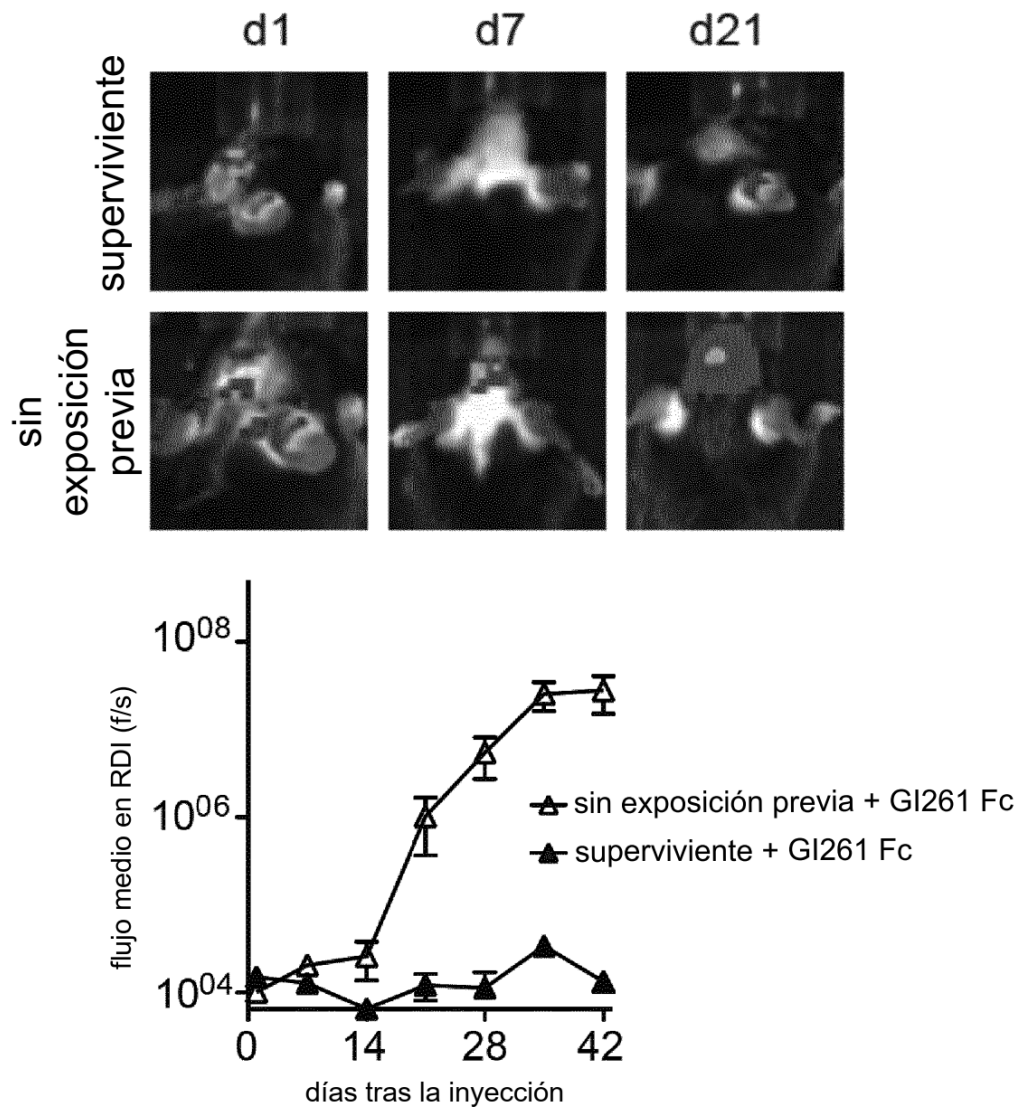


Fig. 6

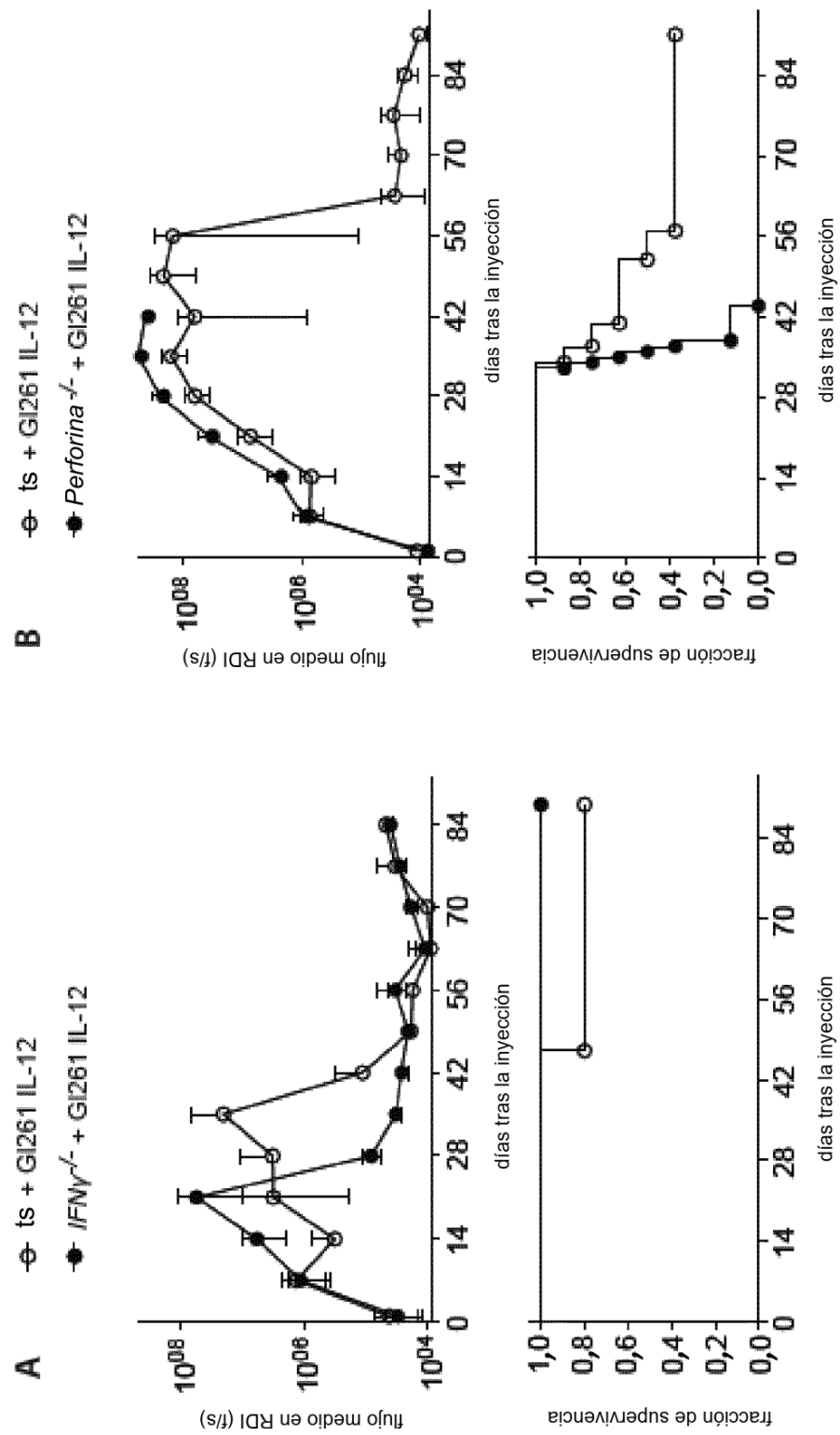


Fig. 7

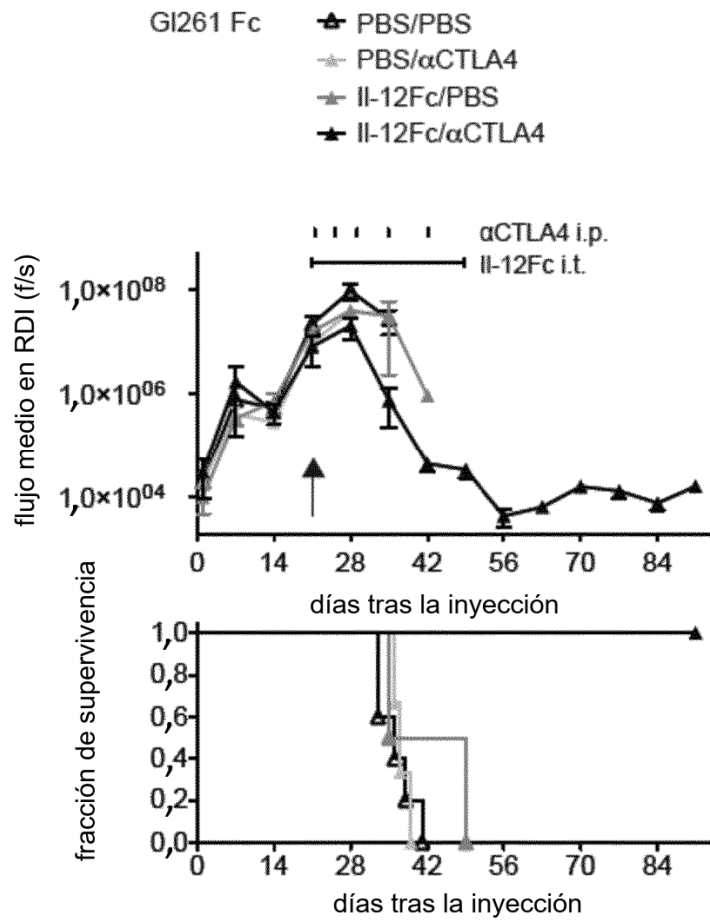
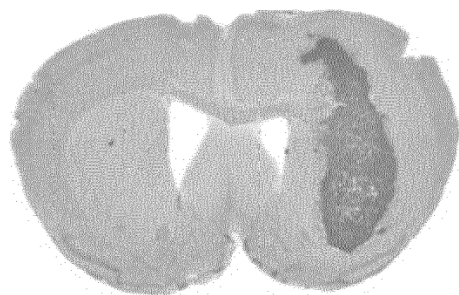
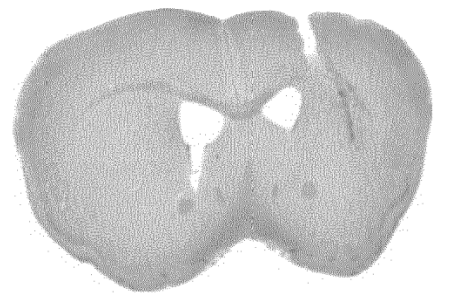


Fig. 8

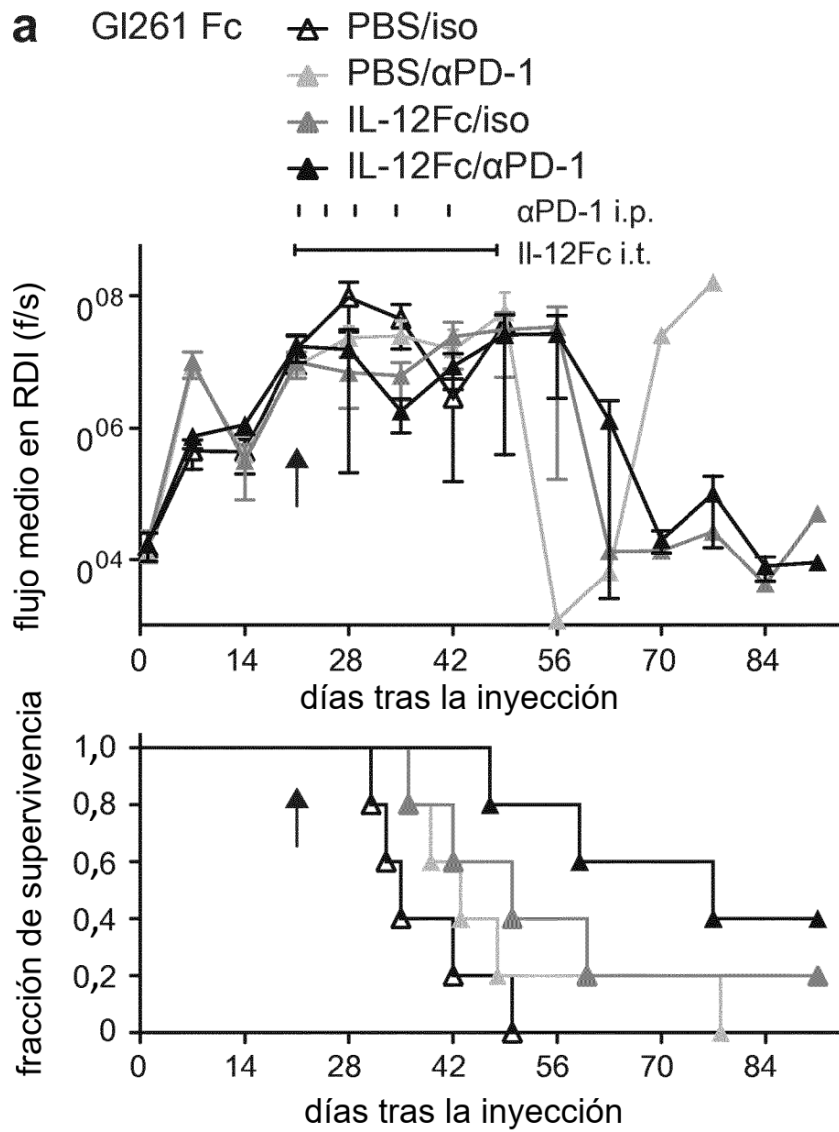


GI261 Fc d 21



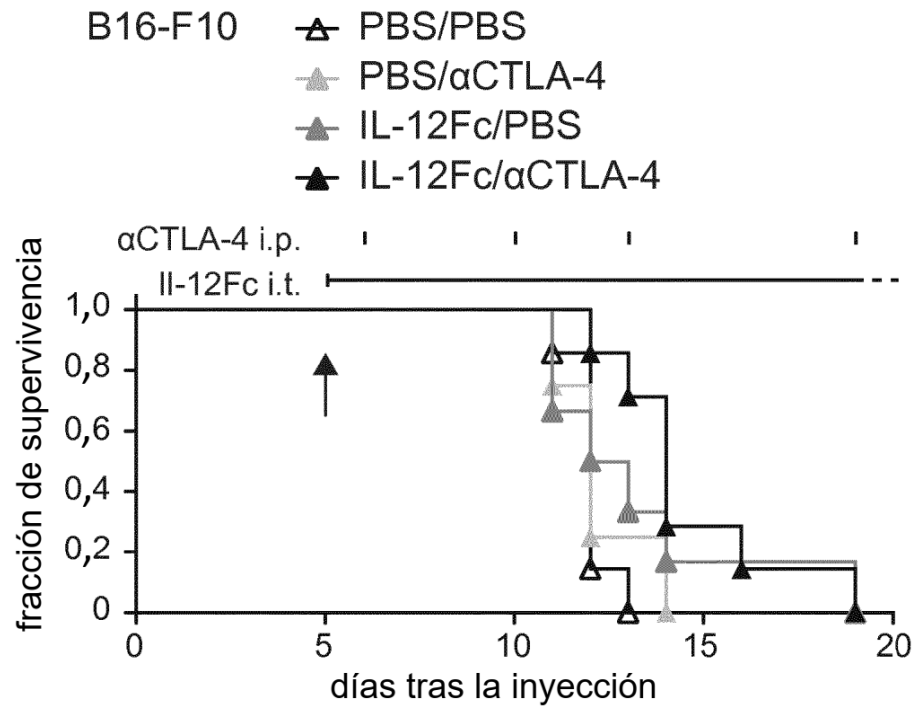
GI261 Fc d 91 tras el
tratamiento con
IL-12Fc/ α CTLA-4

Fig. 9



PBS/PBS frente a IL-12c/αPD-1 $P = 0,0064$

Fig 10



PBS/PBS frente a IL-12c/ α CTLA-4 P = 0,0028

Fig. 11

