

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 985 387**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/55** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2019 PCT/KR2019/011928**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2020 WO20060122**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2019 E 19862449 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024 EP 3715367**

---

(54) Título: **Proteína de fusión que comprende proteína IL-2 y proteína CD80, y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

17.09.2018 KR 20180110698  
07.01.2019 KR 20190001867  
10.04.2019 US 201962832013 P  
08.05.2019 KR 20190053436

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.11.2024**

(73) Titular/es:

**GI INNOVATION, INC. (100.0%)**  
A-1116, 167, Songpa-daero Songpa-gu  
Seoul 05855, KR

(72) Inventor/es:

**JANG, MYUNG HO**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 985 387 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

Proteína de fusión que comprende proteína IL-2 y proteína CD80, y uso de las mismas

## Campo técnico

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína variante de IL-2 y un fragmento de CD80, un dímero del mismo, un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión, un vector que comprende el polinucleótido, una célula transformada en la que se ha introducido el vector y una composición farmacéutica de la misma o proteína de fusión o dímero de la misma para uso en la prevención o el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa.

## Técnica antecedente

La interleucina 2 (IL-2), también llamada factor de crecimiento de células T (TCGF), es una glicoproteína globular que desempeña un papel central en la producción, supervivencia y homeostasis de los linfocitos. IL-2 tiene un tamaño de proteína de 15.5 kDa a 16 kDa y consiste en 133 aminoácidos. La IL-2 media varias acciones inmunitarias uniéndose a un receptor de IL-2 compuesto por tres subunidades distintas.

Además, la IL-2 es sintetizada principalmente por células T activadas, en particular por células T auxiliares CD4+. La IL-2 estimula la proliferación y diferenciación de células T e induce la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL) y la diferenciación de linfocitos de sangre periférica en células citotóxicas y células asesinas activadas por linfocinas (células LAK).

Además, la IL-2 participa en la proliferación y diferenciación de las células B, promueve la síntesis de inmunoglobulinas por parte de las células B y estimula la producción, proliferación y activación de las células asesinas naturales (células NK). Por lo tanto, la IL-2 se utiliza como agente anticancerígeno, porque puede aumentar las poblaciones de linfocitos y aumentar la función de las células inmunitarias en el cuerpo vivo. Actualmente, la terapia con IL-2 ha sido aprobada y utilizada para pacientes con carcinoma de células renales metastásico y melanoma maligno.

Sin embargo, la IL-2 tiene una función dual en las respuestas inmunes en el sentido de que es importante no sólo para mediar en un aumento en el número de células inmunes y la actividad de las mismas, sino también para mantener la tolerancia inmune. Además, se ha informado que la IL-2 puede no ser óptima para inhibir el crecimiento tumoral. La razón es que en presencia de IL-2, puede ocurrir muerte celular inducida por activación (AICD) en los linfocitos T citotóxicos resultantes y las respuestas inmunes pueden ser inhibidas por células T reguladoras dependientes de IL-2 (células Treg) (Imai et al., Cancer Sci 98, 416-423, 2007).

Además, en pacientes que han recibido inmunoterapia con IL-2 se producen efectos secundarios cardiovasculares, pulmonares, renales, hepáticos, gastrointestinales, neuronales, cutáneos, hematológicos y sistémicos graves. Por lo tanto, se han estudiado varias mutaciones de IL-2 para mejorar la eficacia terapéutica de la IL-2 y minimizar los efectos secundarios de la misma (US 5,229,109 B). Sin embargo, todavía quedan muchos problemas por resolver para utilizar la IL-2 con fines farmacológicos.

Mientras tanto, CD80, también conocido como B7-1, es un miembro de la familia B7 de proteínas unidas a membrana que participan en la regulación inmune al unirse a su ligando mediante la administración de respuestas coestimuladoras y respuestas coinhibitorias. CD80 es una proteína transmembrana expresada en la superficie de células T, células B, células dendríticas y monocitos. Se sabe que CD80 se une a CD28, CTLA4 (CD152) y PD-L1. CD80, CD86, CTLA4 y CD28 participan en un sistema coestimulador-coinhibidor. Por ejemplo, regulan la actividad de las células T y participan en su proliferación, diferenciación y supervivencia.

Por ejemplo, cuando CD80 y CD86 interactúan con CD28, se generan señales coestimuladoras para activar las células T. Eventualmente, CD80 se une a CTLA4 y estimula CTLA4 para ser sobreregulada. Como resultado, CD80 inhibe las respuestas de las células T antes de la activación de la respuesta inmune causada por la interacción CD80/CD28. Este circuito de retroalimentación permite una regulación fina de las respuestas inmunitarias.

Además, se sabe que CD80 se une a PD-L1, otro miembro de la familia B7, con una afinidad similar a la que CD28 se une a PD-L1. PD-L1 es conocido como uno de los dos ligandos de la proteína de muerte programada-1 (PD-1), y se sabe que PD-L1 participa en la regulación de las células T. La unión de CD80 a PD-L1 es otro mecanismo que puede bloquear la interacción PD-1/PD-L1, lo que puede prevenir la inhibición de las respuestas de las células T en los tumores. Al mismo tiempo, sin embargo, un aumento en los niveles de CD80 hace que CD80 se una a CD28 de modo que se induce CTLA4, induciendo o inhibiendo así las respuestas de las células T.

KONG LINGHONG ET AL: "Expression of fusion IL2-B7.1(IgV+C) and effects on T lymphocytes", BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE., vol. 85, no. 6, 1 de diciembre

de 2007 (2007-12-01), páginas 685-695 divulgan una proteína de fusión que comprende IL-2 y la región extracelular completa de CD80 (B7.1) (IgV+C) con una región espaciadora flexible.

CHAN ET AL: "1131. Generation of Whole Cell Vaccines for Acute Myeloid Leukaemia by Lentivirus Mediated IL-2/CD80 Transduction", MOLECULAR THERAPY, NO LONGER PUBLISHED BY ELSEVIER, vol. 11, 15 de agosto de 2005 (2005-08-15), página 436 informa el uso de una columna vertebral lentiviral autoinactivante para coexpresar eficientemente CD80 e IL-2 como una única proteína de fusión en blastos de AML primaria.

WO 2017/220989 A1 (KYMAB LIMITED) y su solicitud relacionada US 9 567 399 B1 divulgan una proteína de fusión que comprende una región Fc y una citoquina IL-2.

BARBEE, S. D. et al.: "Abstract B005: FPT155, a novel therapeutic CD 80-Fc fusion protein with potent antitumor activity in preclinical models", AACR-NCI-EORTC International Conference. Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 26 de octubre de 2017 (2017-10-26), Filadelfia, PA informa una proteína de fusión CD80 (B7.1) dominio extracelular (ECD)-Fc (FPT155).

XIAOYING CHEN et al: "Fusion protein linkers: Property, design and functionality", NIH PUBLIC ACCESS AUTHOR MANUSCRIPT, 1 de octubre de 2013, páginas 1-32 describe el uso de dominios Fc como enlazadores en proteínas de fusión.

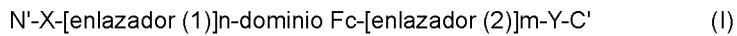
#### Divulgación de la invención

#### Problema técnico

Los presentes inventores han estudiado para desarrollar IL-2 que sea segura y eficaz. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que una nueva proteína de fusión que comprende, en una molécula, una proteína variante de IL-2 y un fragmento de CD80 puede activar células inmunitarias y regular eficazmente las células Treg.

#### Solución al problema

Para lograr el objetivo anterior, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión que comprende una proteína variante de IL-2 y un fragmento de CD80, en la que la proteína de fusión consiste en la siguiente fórmula estructural (I):



en la fórmula estructural (I),

N' es el N-terminal de la proteína de fusión,

C' es el C-terminal de la proteína de fusión,

X es el fragmento CD80, en el que el fragmento CD80 consiste en el aminoácido 35º al aminoácido 242º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

Y es la proteína variante de IL-2, en la que la variante de IL-2 se obtiene mediante sustitución de al menos uno seleccionado entre los aminoácidos 38º, 42º, 45º, 61º y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,

los enlazadores (1) y (2) son enlazadores peptídicos,

y n y m son cada uno independientemente 0 o 1.

En una realización, la variante de IL-2 se obtiene mediante al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En una realización, la variante de IL-2 contiene una cualquiera seleccionada de las siguientes combinaciones de sustitución (a) a (d) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10:

(a) R38A/F42A

(b) R38A/F42A/Y45A

(c) R38A/F42A/E61R

(d) R38A/F42A/L72G.

En una realización, la variante de IL-2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 22, 23 o 24.

En una realización, el dominio Fc es un tipo salvaje o una variante, preferiblemente en donde la variante del dominio Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En una realización, el dominio Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En una realización, el enlazador (1) consiste en 5 a 80 aminoácidos contiguos y el enlazador (2) consiste en 1 a 50 aminoácidos contiguos.

En una realización, el enlazador (1) es un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o el enlazador (2) es un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En una realización, la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 26, 28 o 30.

10 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dímero de proteína obtenido uniendo las dos proteínas de fusión entre sí, preferiblemente en el que el dímero de proteína de fusión es un homodímero.

En aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores.

En una realización, el polinucleótido tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, 25, 27 o 29.

15 En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido del aspecto anterior.

En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula transformada en la que se ha introducido el vector del aspecto anterior.

20 En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en la que la composición farmacéutica comprende como ingrediente activo la proteína de fusión o el dímero de proteína de fusión de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores.

En una realización, la composición farmacéutica para uso según el aspecto anterior comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En una realización, la composición farmacéutica se utiliza para prevenir o tratar cualquier cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia mieloide aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma.

30 En una realización, la composición farmacéutica se utiliza para prevenir o tratar cualquier enfermedad infecciosa seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B, hepatitis C, infección por el virus del papiloma humano, infección por citomegalovirus, enfermedad respiratoria viral, e influenza.

35 En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona la proteína de fusión o el dímero de proteína de fusión de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores para uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa.

40 El asunto objeto al que se hace referencia a continuación como "descrito en el presente documento" o como "un ejemplo" no forma parte de la invención reivindicada como tal, que se define en las reivindicaciones, pero se considera útil para comprender o interpretar la invención. En el presente documento se describe además un uso de la proteína de fusión para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa.

#### Efectos ventajosos de la invención

Una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 no sólo puede activar las células inmunitarias gracias a la IL-2, sino que también regula eficazmente las células Treg gracias a la CD80. Por lo tanto, la proteína de fusión puede atacar las células cancerosas de una manera eficaz y, por tanto, puede emplearse únicamente para el tratamiento del cáncer o de una enfermedad infecciosa.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un ejemplo esquemático de una proteína de fusión.

50 La figura 2 ilustra un mecanismo mediante el cual la proteína de fusión regula dos tipos diferentes de células inmunitarias; sin embargo, debe entenderse que el mecanismo por el cual se expresa la acción de la proteína de fusión no se limita a éste.

La Fig. 3 ilustra un mecanismo por el cual la proteína de fusión exhibe un efecto anticancerígeno.

La Fig. 4 ilustra una vista esquemática de la estructura de la proteína de fusión. Aquí, cada uno de GI101 y mGI101 es un ejemplo de la proteína de fusión en este documento, y GI101C1, GI101C2 y mGI101C1 son ejemplos comparativos para comparar con la actividad de la proteína de fusión.

- 5 La Fig. 5 ilustra varios ejemplos de la proteína de fusión del presente documento. Se pueden combinar proteínas derivadas de humanos y de ratón para preparar una proteína de fusión. La proteína CD80 y la proteína IL-2 pueden unirse entre sí mediante diversos enlazadores distintos de Fc.

La Fig. 6 ilustra un resultado obtenido identificando la proteína de fusión obtenida (GI101) con SDS-PAGE.

La Fig. 7 ilustra cantidades de la proteína de fusión (GI101) dependiendo de la absorbancia.

- 10 La Fig. 8 ilustra un resultado obtenido analizando la proteína de fusión obtenida (GI101) mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

La Fig. 9 ilustra un resultado obtenido identificando la proteína de fusión mGI101 obtenida con SDS-PAGE.

La Fig. 10 ilustra los resultados obtenidos identificando la proteína de fusión GI101C1 obtenida con SDS-PAGE.

La Fig. 11 ilustra los resultados obtenidos identificando la proteína de fusión GI101C2 obtenida con SDS-PAGE.

- 15 La Fig. 12 ilustra un resultado obtenido identificando la proteína de fusión mGI101C1 obtenida con SDS-PAGE.

La Fig. 13 ilustra los resultados obtenidos identificando la proteína de fusión GI102-M45 obtenida con SDS-PAGE.

La Fig. 14 ilustra los resultados obtenidos identificando la proteína de fusión GI102-M61 obtenida con SDS-PAGE.

- 20 La Fig. 15 ilustra los resultados obtenidos identificando la proteína de fusión GI102-M72 obtenida con SDS-PAGE.

La Fig. 16 ilustra la afinidad de unión entre hCTLA4 y GI101.

La Fig. 17 ilustra la afinidad de unión entre hPD-L1 y GI101.

La Fig. 18 ilustra la afinidad de unión entre hPD-L1 y hPD-1.

- 25 La Fig. 19 ilustra la afinidad de unión entre mCTLA4 y mGI101.

La Fig. 20 ilustra la afinidad de unión entre mPD-L1 y mGI101.

Las Figs. 21 y 22 ilustran los resultados obtenidos identificando la capacidad de unión entre GI-101 (hCD80-Fc-hIL-2v) y CTLA-4, y entre GI-101 (hCD80-Fc-hIL-2v) y PD-L1. Se identificó que GI-101 (hCD80-Fc-hIL-2v) tiene una alta capacidad de unión para CTLA-4 y PD-L1.

- 30 La Fig. 23 ilustra un efecto de GI101 sobre la unión de PD-1/PD-L1. GI101 inhibió eficazmente la unión de PD-1/PD-L1.

La Fig. 24 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre GI101 e IL-2R $\alpha$  o IL-2R $\beta$ .

La Fig. 25 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre GI101 e IL-2R $\alpha$ .

La Fig. 26 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre GI101 e IL-2R $\beta$ .

- 35 La Fig. 27 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre IL-2R $\alpha$  y GI102-M45.

La Fig. 28 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre IL-2R $\alpha$  y GI102-M61.

La Fig. 29 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre IL-2R $\alpha$  y GI102-M72.

La Fig. 30 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre IL-2R $\beta$  y GI102-M45.

La Fig. 31 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre IL-2R $\beta$  y GI102-M61.

- 40 La Fig. 32 ilustra los resultados obtenidos identificando la afinidad de unión entre IL-2R $\beta$  y GI102-M72.

Las Figs. 33 y 34 ilustran los resultados obtenidos midiendo cantidades de IFN- $\gamma$  secretadas por las células cuando las células se someten a tratamiento con GI101, GI101C1, GI101C2 o IL-2 en concentraciones respectivas y se realiza la incubación.

5 Las Figs. 35 y 36 ilustran los resultados obtenidos identificando los efectos de GI101, GI101C1, GI101C2 e IL-2 (Proleukin) sobre la proliferación de células T CD8+.

La Fig. 37 ilustra los resultados obtenidos identificando los efectos de GI101 y GI102 sobre la proliferación de células T CD8+ y células T CD4+. Aquí, la Fig. 37A ilustra proporciones de células T CD8+ y células T CD4+, la Fig. 37B ilustra la capacidad de proliferación de células T CD8+ y la Fig. 37C ilustra una proporción de células Treg CD4+/FoxP3+.

10 Las Figs. 38 y 39 ilustran los resultados obtenidos identificando los efectos de GI101 y GI 101 w sobre la proliferación de células T CD8+ y células NK.

Las Figs. 40 y 41 ilustran los resultados obtenidos identificando un efecto de GI101 sobre las células T efectoras.

15 La Fig. 42 ilustra los resultados obtenidos identificando los efectos de mGI101 y mGI102-M61 en células inmunes de ratón.

Las Figs. 43 y 44 ilustran los resultados obtenidos identificando un efecto de GI101 en células cancerosas que sobreexpresan PD-L1.

Las Figs. 45 y 46 ilustran los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor tumoral de GI101 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón.

20 La Fig. 47 ilustra los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor de tumores de mGI101 en ratones trasplantados de melanoma derivado de ratón.

La Fig. 48 ilustra la inhibición tumoral de mGI101 en ratones trasplantados de melanoma derivado de ratón.

La Fig. 49 ilustra los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor tumoral de mGI101, dependiendo de su dosis, en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón.

25 La Fig. 50 ilustra los resultados obtenidos analizando la tasa de supervivencia de ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón que recibieron mGI101.

La Fig. 51 ilustra los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor de tumores de GI101 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón.

30 La Fig. 52 ilustra los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, células T CD8+, células T IFN- $\gamma$ , células T CD4+ y células Treg en tejidos cancerosos.

La Fig. 53 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, células T CD8+, células T IFN- $\gamma$ , células T CD4+ y células Treg en tejidos cancerosos.

35 La Fig. 54 ilustra los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, macrófagos en tejidos cancerosos.

La Fig. 55 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, macrófagos en tejidos cancerosos.

40 La Fig. 56 ilustra los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, células dendríticas en tejidos cancerosos.

45 La Fig. 57 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, células dendríticas en tejidos cancerosos.

La Fig. 58 ilustra los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor de tumores de GI101 en ratones trasplantados con células de cáncer de pulmón derivadas de ratón.

La Fig. 59 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados con células de cáncer de pulmón derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, células T CD8+, células T IFN-γ, células T CD4+ y células Treg en tejidos cancerosos.

La Fig. 60 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer de pulmón derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, macrófagos en tejidos cancerosos.

La Fig. 61 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sometiendo ratones trasplantados de células de cáncer de pulmón derivadas de ratón a tratamiento con hlgG4, anticuerpo anti-PD-1 o GI101, y luego analizando, con FACS, células dendríticas en tejidos cancerosos.

10 La Fig. 62 ilustra los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor de tumores de mGI102-M61 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón.

La Fig. 63 ilustra los resultados obtenidos analizando la tasa de supervivencia de ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón que recibieron mGI102-M61.

15 La Fig. 64 ilustra los resultados obtenidos identificando un efecto inhibidor de tumores de mGI101 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón.

La Fig. 65 ilustra la inhibición tumoral de mGI101 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón.

La Fig. 66 ilustra los resultados obtenidos realizando observaciones clínicas de 15 días para monos que recibieron PBS o GI101.

20 Las Figs. 67 y 68 ilustran los resultados obtenidos midiendo los pesos corporales en los días -1, 1, 8 y 15 para monos que recibieron PBS o GI101.

La Fig. 69 ilustra el consumo de alimentos durante 15 días para monos que recibieron PBS o GI101.

Las Figs. 70 a 72 ilustran los resultados obtenidos analizando la sangre los días -1, 1, 8 y 15 para monos que recibieron PBS o GI101.

25 Las Figs. 73 a 79 ilustran los resultados obtenidos realizando análisis clínicos y químicos los días -1, 1, 8 y 15 para monos que recibieron PBS o GI101.

Las Figs. 80 y 81 ilustran los resultados obtenidos analizando citoquinas en los días -1, 1, 8 y 15 para monos que recibieron PBS o GI101.

30 Las Figs. 82 a 87 ilustran los resultados obtenidos analizando células inmunes en los días -1, 1, 8 y 15 para monos que recibieron PBS o GI101.

La Fig. 88 ilustra los resultados obtenidos sacrificando, el día 16, monos que habían recibido PBS o GI101 para obtener tejidos del bazo, y analizando patológicamente los tejidos del bazo.

35 La Fig. 89 ilustra proteínas de fusión, en cada una de las cuales la proteína CD80 y la proteína IL-2 están unidas a una proteína transportadora. Específicamente, la Fig. 89A ilustra la proteína de fusión en la que la proteína CD80 y la proteína IL-2 están unidas al N-terminal y al C-terminal de la proteína portadora, respectivamente. Además, la Fig. 89B ilustra la proteína de fusión en la que la proteína CD80 y la proteína IL-2 están unidas al C-terminal y al N-terminal de la proteína portadora, respectivamente.

40 Las referencias aquí a métodos de tratamiento deben interpretarse como referencias a los agentes de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Proteína de fusión que comprende proteína IL-2 y proteína CD80.

En el presente documento se describe una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80.

45 Como se usa en el presente documento, el término "IL-2" o "interleucina-2", a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier IL-2 de tipo salvaje obtenida de cualquier fuente de vertebrados, incluidos mamíferos, por ejemplo, primates (tales como humanos) y roedores (como ratones y ratas). La IL-2 se puede obtener a partir de células animales y también incluye una obtenida a partir de células recombinantes capaces de producir IL-2. Además, la IL-2 puede ser IL-2 de tipo salvaje o una variante de la misma.

50 En la presente memoria descriptiva, la IL-2 o una variante de la misma se puede expresar colectivamente mediante el término "proteína IL-2" o "polipéptido de IL-2". La IL-2, una proteína IL-2, un polipéptido de IL-2 y

una variante de IL-2 se unen específicamente, por ejemplo, a un receptor de IL-2. Esta unión específica puede identificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

IL-2 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36. En este caso, la IL-2 también puede estar en una forma madura. Específicamente, la IL-2 madura puede no contener una secuencia señal y puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En este caso, la IL-2 puede usarse bajo un concepto que abarca un fragmento de IL-2 de tipo salvaje en el que una porción del N-terminal o del C-terminal de la IL-2 de tipo salvaje está truncada.

Además, el fragmento de IL-2 puede estar en una forma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos contiguos están truncados desde el N-terminal de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36. Además, el fragmento de IL-2 puede estar en una forma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos contiguos están truncados desde el C-terminal de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36.

Como se usa en el presente documento, el término "variante de IL-2" se refiere a una forma en la que una porción de aminoácidos en la IL-2 de longitud completa o el fragmento de IL-2 descrito anteriormente está sustituido. Es decir, una variante de IL-2 puede tener una secuencia de aminoácidos diferente de la IL-2 de tipo salvaje o un fragmento de la misma. Sin embargo, una variante de IL-2 puede tener una actividad equivalente o similar a la IL-2 de tipo salvaje. En el presente documento, "actividad de IL-2" puede, por ejemplo, referirse a la unión específica a un receptor de IL-2, unión específica que puede medirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Específicamente, se puede obtener una variante de IL-2 mediante la sustitución de una porción de aminoácidos en la IL-2 de tipo salvaje. Un ejemplo de la variante de IL-2 obtenida mediante sustitución de aminoácidos se puede obtener mediante sustitución de al menos uno de los aminoácidos 38°, 42°, 45°, 61°, y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Específicamente, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante sustitución de al menos uno del 38°, 42°, 45°, 61°, o 72° aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 con otro aminoácido. Además, cuando la IL-2 está en una forma en la que una porción del N-terminal en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 está truncado, el aminoácido en una posición correspondiente complementariamente a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 puede sustituirse con otro aminoácido. Por ejemplo, cuando IL-2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, su variante IL-2 se puede obtener mediante sustitución de al menos uno del 58°, 62°, 65°, 81°, o el 92° aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 con otro aminoácido. Estos residuos de aminoácidos corresponden a los residuos de aminoácidos 38°, 42°, 45°, 61°, y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, respectivamente. Se pueden sustituir uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos siempre que dicha variante de IL-2 mantenga la actividad de IL-2. Pueden sustituirse de uno a cinco aminoácidos.

Una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que dos aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38° y 42° aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38° y 45° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38° y 61° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38° y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 42° y 45° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 42° y 61° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 42° y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 45° y 61° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 45° y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 61° y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que tres aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38°, 42° y 45° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38°, 42°, y 61° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38°, 42°, y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38°, 45°, y 61° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38°, 45°, y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 45°, 61° y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 61° y 72° en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 42, 45º, y 61º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 42º, 45º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 45º, 61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

5 Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que cuatro aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38º, 42º, 45º, y 61º aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38º, 42º, 45º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ

10 ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38º, 45º, 61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 38º, 42º, 61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de los aminoácidos 42º, 45º, 61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

15 Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que cinco aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, la variante de IL-2 se puede obtener mediante sustitución de cada uno de los aminoácidos 38º, 42º, 45º, 61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 con otro aminoácido.

20 Aquí, el "otro aminoácido" introducido mediante la sustitución puede ser cualquiera seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Sin embargo, con respecto a la sustitución de aminoácidos por la variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 38º no puede sustituirse por arginina, el aminoácido 42º no puede sustituirse por fenilalanina, el aminoácido 45º no puede sustituirse por tirosina, el 61º aminoácido no puede sustituirse por ácido glutámico y el aminoácido 72º no se puede sustituir por leucina.

25 Respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 38º, arginina puede sustituirse por un aminoácido distinto de arginina. Preferiblemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 38º, arginina puede sustituirse por alanina (R38A).

30 Respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 42º, fenilalanina puede sustituirse por un aminoácido distinto de la fenilalanina. Preferiblemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 42º, fenilalanina puede sustituirse por alanina (F42A).

35 Respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 45º, tirosina puede sustituirse por un aminoácido distinto de tirosina. Preferiblemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 45º, tirosina puede sustituirse por alanina (Y45A).

40 Respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 61º, ácido glutámico puede sustituirse por un aminoácido distinto del ácido glutámico. Preferiblemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 61º, ácido glutámico puede sustituirse por arginina (E61R).

45 Respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 72º, leucina puede sustituirse por un aminoácido distinto de leucina. Preferiblemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos por una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 72º, leucina puede sustituirse por glicina (L72G).

50 Específicamente, se puede obtener una variante de IL-2 mediante al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Específicamente, se puede obtener una variante de IL-2 mediante sustituciones de aminoácidos en dos, tres, cuatro o cinco posiciones entre las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G.

55 Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que dos aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A e F42A. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A y Y45A. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A y E61R. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, F42A e Y45A. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, F42A y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, E61R y L72G.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que tres aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A e Y45A. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A y E61R. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, Y45A y E61R. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, Y45A y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, F42A, Y45A y E61R. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, F42A, Y45A y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, E61R y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, Y45A, E61R y L72G.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que cuatro aminoácidos estén sustituidos. Específicamente, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A, Y45A y E61R. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A, Y45A y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A, E61R y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, Y45A, E61R y L72G. Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, F42A, Y45A, E61R y L72G.

Además, se puede obtener una variante de IL-2 mediante las sustituciones, R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G. Preferiblemente, la variante de IL-2 puede contener cualquiera de las siguientes combinaciones de sustitución (a) a (d) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10:

- 20 (a) R38A/F42A
- (b) R38A/F42A/Y45A
- (c) R38A/F42A/E61R
- (d) R38A/F42A/L72G

Aquí, cuando IL-2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, puede estar presente una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde complementariamente a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, incluso cuando IL-2 es un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, puede estar presente una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde complementariamente a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Específicamente, una variante de IL-2 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 22, 23 o 24.

- 30 (a) Ademá, una variante de IL-2 puede caracterizarse por tener baja toxicidad *in vivo*. Aquí, la baja toxicidad *in vivo* puede ser un efecto secundario causado por la unión de IL-2 a la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2Ra). Se han desarrollado diversas variantes de IL-2 para mejorar el efecto secundario causado por la unión de IL-2 a IL-2Ra, y dichas variantes de IL-2 pueden ser las divulgadas en la Patente US No. 5,229,109 y la Patente coreana N° 1667096. En particular, las variantes de IL-2 descritas en la presente solicitud tienen una baja capacidad de unión para la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2Ra) y por tanto tienen toxicidad *in vivo* menor que la IL-2 de tipo salvaje.

Como se usa en el presente documento, el término "CD80", también llamado "B7-1", es una proteína de membrana presente en células dendríticas, células B activadas y monocitos. CD80 proporciona señales coestimuladoras esenciales para la activación y supervivencia de las células T. CD80 se conoce como ligando de dos proteínas diferentes, CD28 y CTLA-4, presentes en la superficie de las células T. CD80 está compuesto por 288 aminoácidos y puede tener específicamente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Además, como se utiliza en el presente documento, el término "proteína CD80" se refiere a la CD80 de longitud completa o a un fragmento de CD80.

- 45 (b) Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento de CD80" se refiere a una forma escindida de CD80. Además, el fragmento CD80 puede ser un dominio extracelular de CD80. Se puede obtener un ejemplo del fragmento CD80 mediante la eliminación de los aminoácidos 1º a 34º del N-terminal que son una secuencia señal de CD80. Específicamente, el fragmento CD80 puede ser una proteína compuesta por los aminoácidos 35º a 288º aminoácidos en SEQ ID NO: 11. Además, el fragmento CD80 puede ser una proteína compuesta por los 35º a 242º aminoácidos en SEQ ID NO: 11. Además, el fragmento CD80 puede ser una proteína compuesta por los 35º a 232º aminoácidos en SEQ ID NO: 11. Además, el fragmento CD80 puede ser una proteína compuesta por los aminoácidos 35º al 139º en SEQ ID NO: 11. Además, el fragmento CD80 puede ser una proteína compuesta por los aminoácidos 142º a 242º en SEQ ID NO: 11. El fragmento CD80 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

55 Además, la proteína IL-2 y la proteína CD80 pueden unirse entre sí mediante un enlazador o un vehículo. Específicamente, la IL-2 o una variante de la misma y la CD80 (B7-1) o un fragmento de la misma pueden

unirse entre sí mediante un enlazador o un portador. En la presente descripción, el enlazador y el portador se pueden usar indistintamente.

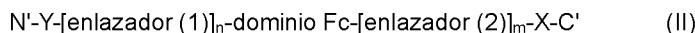
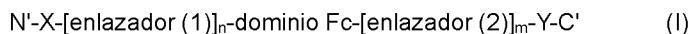
El enlazador enlaza dos proteínas. El enlazador puede incluir de 1 a 50 aminoácidos, albúmina o un fragmento de la misma, un dominio Fc de una inmunoglobulina o similares. Aquí, el dominio Fc de inmunoglobulina se refiere a una proteína que contiene la región constante 2 de la cadena pesada (CH2) y la región constante 3 de la cadena pesada (CH3) de una inmunoglobulina, y no contiene regiones variables de las cadenas pesada y ligera ni la región constante 1 de la cadena ligera (CH1) de una inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede ser IgG, IgA, IgE, IgD o IgM, y preferiblemente puede ser IgG4. Aquí, el dominio Fc de la inmunoglobulina G4 de tipo salvaje puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Además, el dominio Fc de una inmunoglobulina puede ser una variante del dominio Fc así como un dominio Fc de tipo salvaje. Además, como se usa en el presente documento, el término "variante del dominio Fc" puede referirse a una forma que es diferente del dominio Fc de tipo salvaje en términos de patrón de glicosilación, tiene una alta glicosilación en comparación con el dominio Fc de tipo salvaje, o tiene una glicosilación baja en comparación con el dominio Fc de tipo salvaje, o una forma desglicosilada. Además, se incluye en el mismo un dominio Fc aglicosilado. El dominio Fc o una variante del mismo puede adaptarse para tener un número ajustado de ácidos siálicos, fucosilaciones o glicosilaciones, mediante condiciones de cultivo o manipulación genética de un huésped.

Además, la glicosilación del dominio Fc de una inmunoglobulina puede modificarse mediante métodos convencionales tales como métodos químicos, métodos enzimáticos y métodos de ingeniería genética que utilizan microorganismos. Además, la variante del dominio Fc puede estar en una forma mixta de regiones Fc respectivas de inmunoglobulinas, IgG, IgA, IgE, IgD e IgM. Además, la variante del dominio Fc puede estar en una forma en la que algunos aminoácidos del dominio Fc están sustituidos por otros aminoácidos. La variante del dominio Fc puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

La proteína de fusión puede tener una estructura en la que, usando un dominio Fc como enlazador (o portador), una proteína CD80 y una proteína IL-2, o una proteína IL-2 y una proteína CD80 están unidas al N-terminal y C-terminal del enlazador o portador, respectivamente (Fig. 89). El enlace entre el N-terminal o el C-terminal del dominio Fc y CD-80 o IL-2 puede lograrse opcionalmente mediante un péptido enlazador.

Específicamente, una proteína de fusión puede consistir en la siguiente fórmula estructural (I) o (II):



Aquí, en las fórmulas estructurales (I) y (II),

N' es el N-terminal de la proteína de fusión,

C' es el C-terminal de la proteína de fusión,

X es una proteína CD80,

35 Y es una proteína IL-2,

los enlazadores (1) y (2) son enlazadores peptídicos, y

n y m son cada uno independientemente 0 o 1.

Preferiblemente, la proteína de fusión puede consistir en la fórmula estructural (I). La proteína IL-2 es como se describió anteriormente. Además, la proteína CD80 es como se describió anteriormente. La proteína IL-2 puede ser una variante de IL-2 con una a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con la IL-2 de tipo salvaje. La proteína CD80 puede ser un fragmento obtenido mediante truncamiento de hasta aproximadamente 34 residuos de aminoácidos contiguos del N-terminal o C-terminal de la CD80 de tipo salvaje. Alternativamente, la proteína CD puede ser un dominio extracelular similar a una inmunoglobulina que tiene la actividad de unirse a los receptores de superficie de células T CTLA-4 y CD28.

45 Específicamente, la proteína de fusión puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 26, 28 o 30. La proteína de fusión puede incluir un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 26, 28 o 30. En este caso, la identidad es, por ejemplo, el porcentaje de homología y puede determinarse mediante un software de comparación de homologías tal como el software BlastN del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

El enlazador peptídico (1) puede incluirse entre la proteína CD80 y el dominio Fc. El enlazador peptídico (1) puede consistir en 5 a 80 aminoácidos contiguos, de 20 a 60 aminoácidos contiguos, de 25 a 50 aminoácidos

contiguos o de 30 a 40 aminoácidos contiguos. El enlazador peptídico (1) puede consistir en 30 aminoácidos. Además, el enlazador peptídico (1) puede contener al menos una cisteína. Específicamente, el enlazador peptídico (1) puede contener una, dos o tres cisteínas. Además, el enlazador peptídico (1) puede derivar de la bisagra de una inmunoglobulina. El enlazador peptídico (1) puede ser un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

El enlazador peptídico (2) puede consistir en 1 a 50 aminoácidos contiguos, de 3 a 30 aminoácidos contiguos o de 5 a 15 aminoácidos contiguos. El enlazador peptídico (2) puede ser  $(G4S)_n$  (donde n es un número entero de 1 a 10). Aquí, en  $(G4S)_n$ , n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. El enlazador peptídico (2) puede ser un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

10 En el presente documento se describe además un dímero obtenido mediante la unión de dos proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80. La proteína de fusión que comprende IL-2 o una variante de la misma y CD80 o un fragmento de la misma es como se describió anteriormente.

15 Aquí, la unión entre las proteínas de fusión que constituyen el dímero se puede lograr mediante, pero no se limita a, un enlace disulfuro formado por cisteínas presentes en el enlazador. Las proteínas de fusión que constituyen el dímero pueden ser proteínas de fusión iguales o diferentes entre sí. Preferiblemente, el dímero puede ser un homodímero. La proteína de fusión que constituye el dímero puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

#### Proteína de fusión que codifica polinucleótidos

20 En el presente documento se describe además un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80. Específicamente, el polinucleótido puede contener la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, 25, 27 o 29. La proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 es como se describió anteriormente. En el polinucleótido, uno o más nucleótidos pueden alterarse mediante sustitución, delección, inserción o una combinación de los mismos. Cuando se prepara una secuencia de nucleótidos mediante síntesis química, se pueden usar métodos sintéticos bien conocidos en la técnica, como los descritos en Engels y Uhlmann (Angew Chem Int Ed Engl., 37: 73-127, 1988). Dichos métodos pueden incluir métodos de triéster, fosfito, fosforamidita y H-fosfato, PCR y otros métodos de autocebadores, síntesis de oligonucleótidos sobre soportes sólidos y similares.

30 El polipéptido puede contener una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad con la SEQ ID NO: 8, 25, 27 o 29, de al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 % o al menos aproximadamente el 100 %.

35 El polinucleótido puede contener además un ácido nucleico que codifica una secuencia señal o una secuencia líder. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia señal" se refiere a un péptido señal que dirige la secreción de una proteína diana. El péptido señal se traduce y luego se escinde en una célula huésped. Específicamente, la secuencia señal es una secuencia de aminoácidos que inicia la migración de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico (ER). La secuencia señal puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

40 Las secuencias señal son bien conocidas en la técnica por sus características. Dichas secuencias señal contienen típicamente de 16 a 30 residuos de aminoácidos y pueden contener más o menos residuos de aminoácidos que dichos residuos de aminoácidos. Un péptido señal típico se compone de tres regiones, es decir, una región N-terminal básica, una región hidrófoba central y una región C-terminal más polar. La región hidrófoba central contiene de 4 a 12 residuos hidrófobos que hacen que la secuencia señal se inmovilice durante la migración de un polipéptido inmaduro a través de la bicapa lipídica de la membrana.

45 50 Después del inicio, las secuencias señal se escinden en el lumen del ER mediante enzimas celulares, comúnmente conocidas como peptidasas señal. Aquí, la secuencia señal puede ser una secuencia señal secretora de tPa (activador del plasminógeno tisular), gDs del HSV (secuencia señal de la glicoproteína D del virus del herpes simple) o una hormona del crecimiento. Preferiblemente, se puede usar una secuencia señal secretora utilizada en células eucariotas superiores, incluidos mamíferos y similares. Además, se puede usar una secuencia señal incluida en la IL-2 y/o CD-80 de tipo salvaje, o se puede usar una secuencia señal que ha sido sustituida con un codón que tiene una alta frecuencia de expresión en una célula huésped.

#### Vector con polinucleótido que codifica la proteína de fusión

55 En el presente documento se describe además un vector que comprende el polinucleótido.

El vector puede introducirse en una célula huésped para ser recombinado e insertado en el genoma de la célula huésped. O bien, se entiende por vector un ácido nucleico que contiene una secuencia de polinucleótidos que es replicable de forma autónoma como un episoma. Los vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fágidos, cósmidos, vectores de ARN, vectores virales y análogos de los mismos. Los ejemplos del vector viral incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados.

Especificamente, el vector puede incluir ADN plasmídico, ADN de fago y similares; y plásmidos desarrollados comercialmente (pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP y similares), plásmidos derivados de *E. coli* (pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 y similares), plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (pUB 110, pTP5 y similares), plásmidos derivados de levadura (YEp13, YEp24, YCp50 y similares), ADN de fagos (*Charon*4A, *Charon*21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11, λ ZAP y similares), vectores virales animales (retrovirus, adenovirus, virus vaccinia y similares), vectores virales de insectos (baculovirus y similares). Dado que el vector presenta diferentes niveles de expresión y modificación de una proteína dependiendo de la célula huésped, se prefiere seleccionar y utilizar una célula huésped que sea más adecuada para el propósito.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "expresión génica" o "expresión" de una proteína diana significa transcripción de secuencias de ADN, traducción de transcriptos de ARNm y secreción de productos de proteínas de fusión o fragmentos de los mismos. Un vector de expresión útil puede ser *RcCMV* (Invitrogen, Carlsbad) o una variante del mismo. Los vectores de expresión pueden contener además un promotor del citomegalovirus humano (CMV) para promover la transcripción continua de un gen diana en células de mamífero, y una secuencia señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina para aumentar el nivel de estabilidad del ARN después de la transcripción.

Célula transformada que expresa proteína de fusión.

En el presente documento se describe además una célula transformada en la que se ha introducido el vector.

Las células huésped para la célula transformada pueden incluir, pero no se limitan a, células procariotas, células eucariotas y células de origen de mamífero, vegetal, insecto, fúngico o bacteriano. Como ejemplo de células procariotas, se puede utilizar *E. coli*. Además, como ejemplo de células eucariotas, se puede utilizar levadura. Además, para las células de mamífero, se pueden usar células CHO, células F2N, células CSO, células BHK, células de melanoma de Bowes, células HeLa, células 911, células AT1080, células A549, células HEK 293, células HEK293T o similares. Sin embargo, las células de mamífero no se limitan a ellas, y se puede utilizar cualquier célula que los expertos en la técnica conozcan como utilizable como célula huésped de mamífero.

Además, se puede usar para la introducción de un vector de expresión en la célula huésped, la precipitación de CaCh, método de Hanahan cuya eficiencia se ha incrementado mediante el uso de un agente reductor tal como el dimetilsulfóxido (DMSO) en precipitación de CaCl<sub>2</sub>, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, fusión de protoplastos, agitación usando fibra de carburo de silicio, transformación mediada por Agrobacterias, transformación usando PEG, sulfato de dextrano, lipofectamina, o transformación seca/mediada por inhibición, o similares.

Como se describió anteriormente, para optimizar las propiedades de una proteína de fusión como agente terapéutico o para cualquier otro propósito, el patrón de glicosilación de la proteína de fusión (por ejemplo, ácidos siálicos, fucosilaciones, glicosilaciones) se puede ajustar manipulando, mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, genes relacionados con la glicosilación que poseen las células huésped.

#### 40 Método para producir una proteína de fusión

En el presente documento se describe además un método para producir una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80, comprendiendo el método cultivar las células transformadas. Específicamente, el método de producción puede comprender i) cultivar las células transformadas para obtener un cultivo; y ii) recolectar la proteína de fusión del cultivo.

45 El cultivo de las células transformadas se puede llevar a cabo usando métodos bien conocidos en la técnica. Específicamente, el cultivo puede llevarse a cabo en un proceso discontinuo, o realizarse de forma continua en un proceso discontinuo alimentado o en un proceso discontinuo alimentado repetidamente.

#### Uso de proteína de fusión o dímero de la misma

Se describe además en el presente documento una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer o una enfermedad infecciosa, y/o para aumentar la eficacia en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, comprendiendo la composición, como ingrediente activo, una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 o un dímero de proteína de fusión donde están unidas las dos proteínas de fusión.

55 La proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80, o el dímero de proteína de fusión donde están unidas las dos proteínas de fusión es como se describió anteriormente.

El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia mieloide aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma. Además, la enfermedad infecciosa puede ser cualquiera seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B, hepatitis C, infección por el virus del papiloma humano (HPV), infección por citomegalovirus, enfermedad respiratoria viral e influenza.

Una dosis preferida de la composición farmacéutica varía dependiendo del estado y peso corporal del paciente, gravedad de la enfermedad, forma del fármaco, vía y duración de la administración y puede ser seleccionada apropiadamente por los expertos en la técnica. En la composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer o una enfermedad infecciosa de la presente invención, el ingrediente activo puede estar contenido en cualquier cantidad (cantidad eficaz) dependiendo de la aplicación, la forma de dosificación, el propósito de la mezcla y similares, siempre que el ingrediente activo puede exhibir actividad anticancerígena o un efecto terapéutico sobre una enfermedad infecciosa. Una cantidad eficaz convencional del mismo se determinará dentro de un rango de 0.001 % a 20.0 % en peso, basado en el peso total de la composición. Aquí, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un ingrediente activo capaz de inducir un efecto anticancerígeno o un efecto de tratamiento de enfermedades infecciosas. Dicha cantidad eficaz puede determinarse experimentalmente dentro del alcance del conocimiento común de los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" puede usarse para significar tratamiento tanto terapéutico como profiláctico. Aquí, profilaxis puede usarse para significar que se alivia o mitiga una condición o enfermedad patológica de un individuo. El término "tratamiento" puede incluir tanto la aplicación como cualquier forma de administración para tratar una enfermedad en un mamífero, incluido un ser humano. Además, el término incluye inhibir o ralentizar una enfermedad o la progresión de una enfermedad; e incluye significados de restaurar o reparar una función deteriorada o perdida de modo que una enfermedad se alivie parcial o completamente; estimular procesos ineficientes; o aliviar una enfermedad grave.

Como se usa en el presente documento, el término "eficacia" se refiere a la capacidad que puede determinarse mediante uno o parámetros, por ejemplo, supervivencia o supervivencia libre de enfermedad durante un cierto período de tiempo tal como un año, cinco años o diez años. Además, el parámetro puede incluir la inhibición del tamaño de al menos un tumor en un individuo.

Los parámetros farmacocinéticos como la biodisponibilidad y los parámetros subyacentes como la tasa de eliminación también pueden afectar la eficacia. Por lo tanto, la "eficacia potenciada" (por ejemplo, mejora en la eficacia) puede deberse a parámetros farmacocinéticos potenciados y eficacia mejorada, que pueden medirse comparando la tasa de eliminación y el crecimiento tumoral en animales de prueba o sujetos humanos, o comparando parámetros tales como la supervivencia, recurrencia o supervivencia libre de enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición eficaz para prevenir o tratar la enfermedad en cuestión, que es suficiente para tratar la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable al tratamiento médico y no causa efectos adversos. Se puede determinar un nivel de la cantidad eficaz dependiendo de factores que incluyen el estado de salud del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad, la actividad del fármaco, la sensibilidad del paciente al fármaco, el modo de administración, el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción, la duración del tratamiento, formulación o fármacos utilizados simultáneamente, y otros factores bien conocidos en el campo médico. La cantidad terapéuticamente eficaz puede significar una cantidad de fármaco eficaz para tratar el cáncer.

Aquí, la composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier vehículo siempre que sea una sustancia no tóxica adecuada para su administración a un paciente. Como vehículo pueden contener agua destilada, alcohol, grasa, cera y un sólido inerte. La composición farmacéutica también puede contener un adyuvante farmacéuticamente aceptable (tampón, dispersante).

Específicamente, al incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable además del ingrediente activo, la composición farmacéutica se puede preparar en una formulación parenteral dependiendo de su vía de administración usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo no tiene más toxicidad de la que el sujeto al que se va a aplicar (recetar) puede adaptar sin inhibir la actividad del ingrediente activo.

Cuando la composición farmacéutica se prepara en una formulación parenteral, se puede preparar en forma de inyecciones, parches transdérmicos, inhaladores nasales o supositorios con vehículos adecuados según métodos conocidos en la técnica. En caso de preparación para inyecciones, se puede utilizar como vehículo adecuado agua esterilizada, etanol, poliol tal como glicerol o propilenglicol, o una mezcla de los mismos; y preferiblemente se puede usar una solución isotónica, tal como solución de Ringer, solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene trietanolamina o agua estéril para inyección y dextrosa al 5%, o similar. La formulación de composiciones farmacéuticas se conoce en la técnica y se puede hacer referencia

específicamente a Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995) y similares. Este documento se considera parte de la presente descripción.

Una dosis preferida de la composición farmacéutica puede oscilar entre 0.01 µg/kg y 10 g/kg, o entre 0.01 mg/kg y 1 g/kg, por día, dependiendo del estado del paciente, peso corporal, sexo, edad, gravedad del paciente y vía de administración. La dosis puede administrarse una vez al día o dividirse en varias veces al día. Dicha dosis no debe interpretarse como limitante del alcance de la presente invención en ningún aspecto.

Los sujetos a los que se puede aplicar (prescribir) la composición farmacéutica son mamíferos y humanos, siendo particularmente preferidos los seres humanos. Además del ingrediente activo, la composición farmacéutica de la presente solicitud puede contener además cualquier compuesto o extracto natural, cuya seguridad ya haya sido validada y se sepa que tiene actividad anticancerígena o un efecto terapéutico sobre una enfermedad infecciosa, para potenciar o reforzar la actividad anticancerígena.

En el presente documento se describe además el uso de una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa.

En el presente documento se describe además el uso de una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 para potenciar un efecto terapéutico sobre el cáncer o una enfermedad infecciosa.

En el presente documento se describe además el uso de una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa.

Se describe además en el presente documento un método para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa, y/o un método para mejorar un efecto terapéutico sobre el cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende administrar, a un sujeto, una proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80 o un dímero de proteína de fusión donde se unen las dos proteínas de fusión.

El sujeto puede ser un individuo que padece cáncer o una enfermedad infecciosa. Además, el sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un humano. La proteína de fusión que comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80, o el dímero de proteína de fusión donde están unidas las dos proteínas de fusión es como se describió anteriormente.

La vía de administración, la dosis y la frecuencia de administración de la proteína de fusión o del dímero de proteína de fusión pueden variar dependiendo del estado del paciente y de la presencia o ausencia de efectos secundarios, y por tanto la proteína de fusión o el dímero de proteína de fusión se pueden administrar a un sujeto en diversas formas y cantidades. Los expertos en la técnica pueden seleccionar el método de administración, la dosis y la frecuencia de administración óptimos en un rango apropiado. Además, la proteína de fusión o el dímero de proteína de fusión se pueden administrar en combinación con otros fármacos o sustancias fisiológicamente activas cuyo efecto terapéutico se conoce con respecto a una enfermedad a tratar, o se pueden formular en forma de preparaciones de combinación con otros fármacos.

Debido a la actividad de IL-2, la proteína de fusión descrita en el presente documento puede activar células inmunitarias tales como las células asesinas naturales. Por tanto, la proteína de fusión se puede utilizar eficazmente para el cáncer y las enfermedades infecciosas. En particular, se identificó que, en comparación con el tipo salvaje, una variante de IL-2 con dos a cinco sustituciones de aminoácidos, en particular, una variante de IL-2 que contiene sustituciones de aminoácidos en dos, tres, cuatro o cinco posiciones entre las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G, tiene una baja capacidad de unión para la cadena alfa del receptor de IL-2 y por lo tanto exhibe características mejoradas con respecto a los efectos secundarios farmacológicos de la IL-2 convencional. Por lo tanto, dicha variante de IL-2, cuando se usa sola o en forma de una proteína de fusión, puede disminuir la incidencia del síndrome de fuga vascular (o capilar) (VLS), un problema con la IL-2 convencionalmente conocido.

#### 45 Modo para la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son sólo para ilustrar la presente invención.

##### I. Preparación de proteína de fusión.

##### Ejemplo de preparación 1. Preparación de la variante hCD80-Fc-IL-2 (2M): GI101

Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una variante de IL-2, se sintetizó un polinucleótido a través del servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID

NO: 5), y una variante de IL-2 (2M) (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) que tiene dos sustituciones de aminoácidos, en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 9. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI101".

La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía que contenía resina de proteína A MabSelect SuRe. La proteína de fusión se unió al mismo en condiciones de Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7.4. Luego, se realizó la elución con NaCl 100 mM, ácido acético 100 mM, pH 3. Se colocó Tris-HCl 1 M al 20 % a pH 9 en un tubo de recolección y luego se recolectó la proteína de fusión. Para la proteína de fusión recolectada, el tampón se intercambió mediante diáfiltración con tampón PBS durante 16 horas.

Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, a lo largo del tiempo, con cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna TSKgel G3000SWXL (TOSOH Bioscience), para obtener una proteína de fusión altamente concentrada. Aquí, la proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 6). Se identificó que la proteína de fusión estaba contenida en una concentración de 2.78 mg/ml cuando se detectó con NanoDrop (Fig. 7). Además, en la Fig. 8 se proporcionan los resultados obtenidos mediante análisis usando cromatografía de exclusión por tamaño.

#### **Ejemplo de preparación 2. Preparación de la variante mCD80-Fc-IL-2 (2M): mGI101**

Para producir una proteína de fusión que comprende un CD80 de ratón, un dominio Fc y una variante de IL-2, se sintetizó un polinucleótido a través del servicio de síntesis genética Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 14) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un mCD80 (SEQ ID NO: 13), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), y una variante de IL-2 (2M) (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) con dos sustituciones de aminoácidos, en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 15. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "mGI101".

La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 9). Se descubrió que la proteína de fusión estaba contenida en una concentración de 1.95 mg/ml cuando se detectó mediante absorbancia a 280 nm usando NanoDrop.

#### **Ejemplo de preparación 3. Preparación de hCD80-Fc: GI101C1**

Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento de CD80 humano y un dominio Fc, se sintetizó un polinucleótido a través del servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 16) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), y un dominio Fc (SEQ ID NO: 4). El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 17. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI101C1".

La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 10). Se observó que la proteína de fusión estaba contenida en una concentración de 3.61 mg/ml cuando se detectó mediante absorbancia a 280 nm usando NanoDrop.

#### **Ejemplo de preparación 4. Preparación de la variante Fc-IL-2 (2M): GI101C2**

Para producir una proteína de fusión que comprende un dominio Fc y una variante de IL-2, se sintetizó un polinucleótido a través del servicio de síntesis genética Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 18) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), y una variante de IL-2 (2M) (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) con dos sustituciones de aminoácidos, en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 19.

Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI101C2".

5 La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 11). Se descubrió que la proteína de fusión estaba contenida en una concentración de 4.79 mg/ml cuando se detectó mediante absorbancia a 280 nm usando NanoDrop.

#### Ejemplo de preparación 5. Preparación de mCD80-Fc: mGI01C1

10 Para producir una proteína de fusión que comprende un CD80 de ratón y un dominio Fc, se sintetizó un polinucleótido a través del servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un mCD80 (SEQ ID NO: 13), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), y un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 21. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "mGI101C1".

15 20 La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 12). Se observó que la proteína de fusión estaba contenida en una concentración de 2.49 mg/ml cuando se detectó mediante absorbancia a 280 nm usando NanoDrop.

25 Las proteínas de fusión preparadas en los Ejemplos de preparación 1 a 5 se resumen en la Tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Artículo	N-terminal	Enlazador	C'-terminal
Ejemplo de preparación 1 (GI101)	fragmento hCD80	dominio Fc	hIL-2m
Ejemplo de preparación 2 (mGI101)	fragmento mCD80	dominio Fc	hIL-2m
Ejemplo de preparación 3 (GI101C1)	fragmento CD80	dominio Fc	-
Ejemplo de preparación 4 (GI101C2)	-	dominio Fc	IL-2m
Ejemplo de preparación 5 (mGI101C1)	fragmento mCD80	dominio Fc	-

#### Ejemplo de preparación 6. Preparación de CD80-Fc-IL-2: GI101w

30 Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una IL-2 humana, se sintetizó un polinucleótido a través del servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 31) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), e IL-2 humana madura (SEQ ID NO: 10), en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 32. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI101w". La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1.

#### Ejemplo de preparación 7. Preparación de la variante hCD80-Fc-IL-2 (3M): GI102-M45

Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una variante de IL-2 (3M) (R38A, F42A, Y45A) (GI102-M45) con tres sustituciones de aminoácidos, se sintetizó un polinucleótido a través del Servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 25) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), y una variante de IL-2 (SEQ ID NO: 22), en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 26. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI102-M45".

La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 13).

#### **15 Ejemplo de preparación 8. Preparación de la variante hCD80-Fc-IL-2 (3M): GI102-M61**

Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una variante de IL-2 (3M) (R38A, F42A, E61R) (GI102-M61) con tres sustituciones de aminoácidos, se sintetizó un polinucleótido a través del Servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 27) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), y una variante de IL-2 (SEQ ID NO: 23), en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 28. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI102-M61".

La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 14).

#### **30 Ejemplo de preparación 9. Preparación de hCD80-Fc-IL-3M: GI102-M72**

Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una variante de IL-2 (3M) (R38A, F42A, L72G) (GI102-M72) con tres sustituciones de aminoácidos, se sintetizó un polinucleótido a través del Servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 29) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), y una variante de IL-2 (SEQ ID NO: 24), en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 30. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "GI102-M72".

La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reducidas (R) o no reducidas (NR) y se tiñó con azul de Coomassie para comprobar su pureza (Fig. 15).

#### **45 Ejemplo de preparación 10. Preparación de mCD80-Fc-IL-3M: mGI102-M61**

Para producir una proteína de fusión que comprende un fragmento CD80 de ratón, un dominio Fc y una variante de IL-2 (3M) (R38A, F42A, E61R) (GI102-M61) con tres sustituciones de aminoácidos, se sintetizó un polinucleótido a través del Servicio de síntesis de genes Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific. Específicamente, el polinucleótido contiene una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33) que codifica una proteína de fusión que contiene un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de mCD80 (SEQ ID NO: 13), una bisagra Ig (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5), y una variante de IL-2 (SEQ ID NO: 23), en este orden, desde el N-terminal. El polinucleótido se insertó en el vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (Expi-CHO™) para expresar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 34. Después de la introducción del vector, el cultivo se realizó durante 7 días en un ambiente de 37 °C, 125 RPM y concentración de 8 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se recolectó el cultivo y se purificó la proteína de fusión del mismo. La proteína de fusión purificada se denominó "mGI102-M61".

La purificación y recolección de la proteína de fusión se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1.

II. Identificación de la afinidad de unión entre la proteína de fusión y su ligando

Para identificar la afinidad de unión entre la proteína de fusión y su ligando, la afinidad de unión se midió usando Octet RED 384.

**Ejemplo experimental 1. Identificación de afinidad de unión entre hCTLA-4 y GI101**

- 5 Biosensor AR2G (Amina Reactiva 2<sup>do</sup> gen, ForteBio, Cat: 18-5092) se hidrató previamente con 200 µl de agua destilada en una microplaca de 96 pocillos (GreinerBio-one, Cat: 655209). Un ligando (CTLA-4, CTLA-4 humano/CD152, etiqueta His, Sino Biological, Cat: 11159-H08H) que se unirá al biosensor AR2G se diluyó con tampón acetato 10 mM (pH 5, kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) hasta una concentración de 5 µg/ml. Además, el GI101 que se unirá al ligando se diluyó con tampón cinético AR2G 1X (kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) a una concentración de 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM o 62.5 nM. El tampón de activación se preparó mezclando EDC 20 mM y s-NHS 10 mM (kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) en agua destilada. Se colocaron 80 µl de cada reactivo en una microplaca de 384 pocillos (Greiner Bio-one, Cat: 781209) y se configuró el programa.
- 10

Como resultado, se midió la afinidad de unión entre hCTLA-4 y GI101 como se ilustra en la Fig. 16.

15 **Ejemplo experimental 2. Identificación de la afinidad de unión entre hPD-L1/GI101 y hPD-L1/PD-1**

- Ni-NTA (Tris-NTA cargado con níquel, Ni-NTA Biosensors, ForteBio, 18-5101) se hidrató previamente con 200 µl de tampón cinético Ni-NTA 1X (tampón cinético 10X, ForteBio, 18-1042) en una microplaca de 96 pocillos (GreinerBio-one, Cat: 655209). Un ligando (proteína humana PD-L1/B7-H1, etiqueta His, Sino Biological, Cat: 10084-H08H) que se unirá a los biosensores de Ni-NTA se diluyó con tampón cinético de Ni-NTA 1X hasta una concentración de 5 µg/ml. GI101 que se unirá al ligando se diluyó con tampón cinético Ni-NTA 1X a 1,000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM o 62.5 nM. Además, PD-1/PDCCD1 humano (PD-1/PDCCD1 humano, etiqueta Fc, Sino Biological, Cat: 10377-H02H) que se unirá al ligando se diluyó con tampón cinético Ni-NTA 1X hasta una concentración de 2000 nM, 1000 nM, 500 nM, 250 nM o 125 nM. Luego, se colocaron 80 µl de cada reactivo en una microplaca de 384 pocillos y se configuró el programa.

- 25 Como resultado, se midió la afinidad de unión entre hPD-L1 y GI101 como se ilustra en la Fig. 17. Además, se midió la afinidad de unión entre hPD-L1 y hPD-1 como se ilustra en la Fig. 18.

**Ejemplo experimental 3. Identificación de la afinidad de unión entre mCTLA-4 y mGI101**

- La afinidad de unión entre mCTLA-4 y mGI101 se examinó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 1. En este caso, el equipo utilizado es el siguiente: Biosensor: AR2G, Ligando: mCTLA-4 (quimera CTLA-4 Fc de ratón recombinante, R&D Systems, Cat: 434-CT-200), Analito: mGI101 (500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).

Como resultado, se midió la afinidad de unión entre mCTLA-4 y mGI101 como se ilustra en la Fig. 19.

**Ejemplo experimental 4. Identificación de la afinidad de unión entre mPD-L1 y mGI101**

- La afinidad de unión entre mPD-L1 y mGI 101 se identificó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 1. Aquí, el equipo utilizado es el siguiente. Biosensor: AR2G, Ligando: mPD-L1 (quimera recombinante de ratón B7-H1/PD-L1 Fc, R&D Systems, Cat: 434-CT-200), Analito: mGI101 (500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.3 nM).

Como resultado, se midió la afinidad de unión entre mPD-L1 y mGI 101 como se ilustra en la Fig. 20.

40 **Ejemplo experimental 5. Identificación de la capacidad de unión de GI-101 (hCD80-Fc-hIL-2v) a CTLA-4 y PD-L1**

- Las mediciones de la cinética de unión se realizaron utilizando el instrumento Octet RED 384 (ForteBio, Pall Life Science) con agitación a 30 °C y 1,000 rpm. La capacidad de unión de CTLA-4 se midió utilizando el chip biosensor Amine Reactive 2 generación (AR2G), y la capacidad de unión de PD-L1 se midió utilizando el chip biosensor Tris-NTA (Ni-NTA) cargado con níquel. El chip biosensor AR2G se activó con una combinación de EDC 400 mM y sulfo-NHS 100 mM. Luego, CTLA-4-His Tag humana (Sino Biological, Cat: 11159-H08H) se diluyó con tampón acetato 10 mM (pH 5) a 5 µg/ml, se cargó en el chip biosensor AR2G durante 300 segundos y se fijó.

- 45 Luego, la unión de CTLA-4 a GI-101 (hCD80-Fc-hIL-2v), GI-101C1 (hCD80-Fc), Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y GI-101C2 (Fc-hIL-2v) en diversas concentraciones se midieron durante 300 segundos y también se midió su disociación durante 300 segundos. Por otro lado, la PD-L 1-His Tag Humana (Sino biological, Cat: 10084-H08H) se diluyó con tampón cinético 1XNi-NTA hasta una concentración de 5 µg/ml, se cargó en el chip biosensor Ni-NTA durante 600 segundos y se fijó. Luego, la unión de PD-L1 a GI-101, GI-101C1, hPD-1-Fc (Sino biological, Cat: 10377-H02H), y GI101C2 en diversas concentraciones se midió durante 300 segundos y

también se midió la disociación de los mismos durante 300 segundos. El análisis de la cinética de unión se realizó utilizando el software Octet Data Analysis HT ver. 10 proporcionado por Pall Corporation. Los resultados se ilustran en las Figs. 21 y 22.

**Ejemplo experimental 6. Identificación del efecto de GI-101 (hCD80-Fc-hIL-2v) sobre la unión de PD-1/PD-L1**

Se realizó un experimento de bloqueo utilizando el instrumento Octet RED 384 (ForteBio, Pall Life Science) con agitación a 30 °C y 1,000 rpm. La PD-L1-His Tag Humana (Sino biological, Gato: 10084-H08H) se diluyó con tampón cinético 1XNi-NTA hasta una concentración de 5 µg/ml, se cargó en el chip biosensor Ni-NTA durante 600 segundos y se fijó. Para continuar con el experimento de bloqueo, se permitió que hPD-L1 fijado en el chip biosensor se uniera a GI-101 en varias concentraciones (300 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM y 0 nM) durante 600 segundos, y luego nuevamente se le permitió unirse al PD-1 humano competidor (100 nM) durante 600 segundos para medir cuánto más hPD-L1 se puede unir al mismo. Por el contrario, se permitió que hPD-L1 se uniera a hPD-1 en diversas concentraciones (300 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM y 0 nM) durante 600 segundos, y luego se le permitió nuevamente unirse al competidor GI-101 (100 nM) durante 600 segundos para medir cuánto más GI-101 puede unirse al mismo. El experimento de bloqueo se analizó utilizando el menú de agrupación de epítopos del software Octet Data Analysis HT ver. 10 proporcionado por Pall Corporation. Los resultados se ilustran en la Fig. 23.

**Ejemplo experimental 7. Identificación de la afinidad de unión entre IL-2Ra o IL-2Rp y GI101**

La capacidad de unión de IL-2Ra se midió utilizando el biosensor AR2G, y la capacidad de unión de IL-2Rβ se midió utilizando los biosensores Ni-NTA (Tris-NTA cargado con níquel, Ni-NTA Biosensors, ForteBio, 18-5101).

Un ligando (IL-2Ra-His Tag, Acro, Cat: ILA-H52H9) que se unirá al biosensor AR2G se diluyó con tampón acetato 10 mM (pH 5, kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) hasta una concentración de 5 µg/ml. El biosensor AR2G se activó con un tampón preparado mezclando EDC 400 mM y sulfo-NHS 100 mM, y luego el ligando diluido se cargó en el biosensor AR2G durante 300 segundos y se fijó.

Mientras tanto, un ligando (IL-2Rβ-His Tag, Aero, Cat: CD2-H5221) que se unirá al biosensor de Ni-NTA se diluyó con tampón cinético de Ni-NTA 1X hasta una concentración de 5 µg/ml. El ligando diluido se cargó en el biosensor Ni-NTA durante 600 segundos y se fijó.

A continuación, se cargó GI101, GI101w, o Proleukin (Novartis, hIL-2), en diversas concentraciones, para unirse al ligando durante 300 segundos. Luego, se midió su unión y también se midió su disociación durante 300 segundos. El análisis de la cinética de unión se realizó utilizando el software Octet Data Analysis HT ver. 10 proporcionado por Pall Corporation. Los resultados se ilustran en las Figs. 24 al 26.

Como resultado, se identificó que GI101 tiene una baja capacidad de unión para la cadena alfa del receptor de IL-2, IL-2Ra, y una alta capacidad de unión para IL-2Rβ, en comparación con GI101w y Proleukin.

**Ejemplo experimental 8. Medición de la afinidad de unión entre la proteína de fusión y el ligando**

Para identificar la afinidad de unión entre la proteína de fusión y su ligando, se midió la afinidad de unión usando Octet RED 384.

**Ejemplo experimental 8.1. Identificación de la afinidad de unión entre el receptor alfa IL2 y GI101-M45, GI101-M61 o GI101-M72**

El biosensor AR2G (Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, Cat: 18-5092) se hidrató previamente con 200 µl de agua destilada (DW) en una microplaca de 96 pocillos (GreinerBio-one, Cat: 655209). Un ligando (proteína alfa IL-2 R humana, His Tag, Aero, ILA-H52H9) que se unirá al biosensor se diluyó con tampón acetato 10 mM (pH 5) (kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) hasta una concentración de 5 µg/ml. Un analito (GI101-M45, GI101-M61, GI101-M72) que se unirá al ligando se diluyó con tampón cinético AR2G 1X (kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) a 500 nM, 250 nM, 125 nM y 62.5 nM, respectivamente. El tampón de activación se preparó mezclando EDC 20 mM y s-NHS 10 mM (kit de reactivos AR2G, ForteBio, Cat: 18-5095) en DW. Se colocaron 80 µl de cada reactivo en una microplaca de 384 pocillos (Greiner Bio-one, Cat: 781209) y se configuró el programa.

Como resultado, la afinidad de unión entre el receptor IL2 alfa y GI101-M45 se ilustra en la Fig. 27. Además, la afinidad de unión entre el receptor IL2 alfa y GI101-M61 se ilustra en la Fig. 28, y la afinidad de unión entre el receptor IL2 alfa y GI101-M72 se ilustra en la Fig. 29.

**Ejemplo experimental 8.2. Identificación de la afinidad de unión de GI102-M45, GI102-M61 y GI102-M72 a IL-2Rβ**

Los biosensores Ni-NTA se hidrataron previamente con 200 µl de tampón cinético Ni-NTA 1X (tampón cinético 10X, ForteBio, 18-1042) en una microplaca de 96 pocillos. Un ligando (proteína beta IL-2 R humana, His-Tag,

Acro, CD2-H5221) que se unirá al biosensor se diluyó con tampón cinético Ni-NTA 1X hasta una concentración de 2 µg/ml. GI102-M45, GI102-M61 o GI102-M72 que se unirán al ligando se diluyeron con tampón cinético Ni-NTA 1X hasta una concentración de 500 nM, 250 nM, 125 nM o 62.5 nM. Se colocaron 80 µl de cada reactivo en una microplaca de 384 pocillos y se configuró el programa.

- 5 Como resultado, la afinidad de unión entre IL-2R $\beta$  y GI102-M45 se midió como se ilustra en la Fig. 30, y la afinidad de unión entre IL-2R $\beta$  y GI102-M61 se midió como se ilustra en la Fig. 31. Además, se midió la afinidad de unión entre IL-2R $\beta$  y GI102-M72 como se ilustra en la Fig. 32.

### III. Identificación de la actividad inmune de la proteína de fusión

#### **Ejemplo experimental 9. Identificación de la producción de IFN- $\gamma$ causada por la proteína de fusión**

##### 10 **Ejemplo experimental 9.1. Cultivo de PBMCs marcadas con CFSE**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas de un humano se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) haciéndolas reaccionar con colorante CellTrace CFSE 1 µM a 37 °C durante 20 minutos. El CFSE no unido a las células se eliminó haciéndolo reaccionar durante 5 minutos con un medio de cultivo que tenía un volumen 5 veces mayor de la solución de reacción de tinción y luego centrifugándolo a 1,300 rpm durante 5 minutos. Las PBMC marcadas con CFSE se resuspendieron en el medio de cultivo (medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, HEPES 10 mM, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 55 µM, aminoácidos no esenciales 1 mM, y L-glutamina 2 mM), y luego se añadió a una placa de 96 pocillos a  $1 \times 10^5$  células por pocillo. Se realizó el tratamiento con 5 µg/ml de PHA (lactina de Phaseolus vulgaris, frijol riñón rojo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Cat. No. L1668-5MG), y GI101, GI101C1, GI101C2 o IL-2 (Aldesleukin; IL-2 recombinante humana, Novartis) y la incubación se realizó en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C durante 6 días.

Aquí, el tratamiento con GI101, GI101C1, GI101C2 e IL-2 se realizó a una concentración de 1 nM, 10 nM o 100 nM. Las células se analizaron mediante FACS y se midió el IFN- $\gamma$  humano presente en el medio de cultivo utilizando un kit ELISA (Biolegend, San Diego, CA, USA, Cat. No. 430103).

##### 25 **Ejemplo experimental 9.2. Análisis FACS**

Los sedimentos celulares obtenidos eliminando el sobrenadante se lavaron con tampón FACS (3% FBS, EDTA 10 mM, HEPES 1 M, penicilina estreptomicina 100 unidades/ml, 10 µg/ml, piruvato de sodio 1 mM) y luego reaccionaron con bloqueador de Fc (Bioleyenda, Cat. No. 422302) a 4°C durante 5 minutos. Luego, el tratamiento con Ab APC anti-CD3 (Biolegend, Cat. No. 300412) y Ab PE anti-CD8a (Biolegend, Cat. No. 300908) y se dejó que la reacción prosiguiera a 4°C durante 20 minutos. Luego, el resultado se lavó con tampón FACS. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón FACS y luego se analizaron utilizando BD LSR Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) y el software FlowJo.

#### **Ejemplo experimental 9.3. ELISA de IFN- $\gamma$ humano**

35 La cantidad de IFN- $\gamma$  humano secretada en el sobrenadante de cada muestra en la que se habían cultivado las células se midió usando un kit ELISA de IFN- $\gamma$  humano (Biolegend, Cat. No. 430103). En resumen, se añadieron anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  humano a una placa de ELISA y se dejó que la reacción transcurriera durante la noche a 4°C para que estos anticuerpos quedaran recubiertos sobre la misma. Luego, se realizó el bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora con una solución de PBS a la que se había añadido BSA al 1%. Se realizó un lavado con un tampón de lavado (Tween-20 al 0.05 % en PBS) y luego se diluyeron adecuadamente y se añadieron a la misma una solución estándar y cada muestra. Luego, se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 2 horas.

40 Una vez completada la reacción, se lavó la placa y se le añadieron anticuerpos secundarios (anticuerpos de detección). Se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizó un lavado con un tampón de lavado y luego se le añadió una solución de Avidina-HRP. Se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se le añadió una solución de sustrato y se indujo la reacción de desarrollo de color en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al mismo para detener la reacción de desarrollo de color y se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

45 Como resultado, se encontró que las células tratadas con GI101 exhibieron un aumento notable en la secreción de IFN- $\gamma$ , en comparación con las células tratadas con GI101C1, GI101C2 o IL-2 (Figs. 33 y 34).

#### **Ejemplo experimental 10. Identificación del efecto de GI101 sobre la proliferación de células T CD8+.**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un humano se marcaron con CFSE haciéndolas reaccionar con colorante CellTrace CFSE 1 µM a 37 °C durante 20 minutos. El CFSE no unido a las células se eliminó haciéndolo reaccionar durante 5 minutos con un medio de cultivo que tenía un volumen

5 veces mayor de la solución de reacción de tinción y luego centrifugándolo a 1,300 rpm durante 5 minutos. Las PBMC marcadas con CFB se resuspendieron en el medio de cultivo (medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, HEPES 10 mM, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 55 µM, aminoácidos no esenciales 1 mM, y L-glutamina 2 mM), y luego se añadió a una placa de 96 pocillos a  $1 \times 10^5$  células por pocillo.

5 Posteriormente, se realizó el tratamiento con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3ε (Biolegend Cat. No. L1668-5MG), y GI101, GI101C1, GI101C2 o Proleukin (Novartis) y la incubación se realizó en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 6 días. Aquí, las células se trataron con GI101, GI101C1, GI101C2 e IL-2 a una concentración de 100 nM. Se examinó el grado de proliferación de las células incubadas midiendo, con análisis FACS usando anticuerpos APC-TCRqβ y PE-CD8α, una proporción de células T CD8+ que no habían sido marcadas con CFSE.

10 Como resultado, se descubrió que GI101 activaba la proliferación de células T CD8+ *in vitro* en un grado similar a la Proleukin IL-2 de tipo salvaje (Figs. 35 y 36).

15 **Ejemplo experimental 11. Identificación del efecto de GI101 y GI102 sobre la proliferación de células T CD8+**

20 Las PBMC humanas se adquirieron de Allcells (lote # 3014928, USA). Se utilizó colorante CellTrace CFSE 1 M, que se hizo reaccionar con las PBMC humanas en condiciones de bloqueo de la luz a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las células se marcaron con CFSE haciéndolas reaccionar con colorante CellTrace CFSE 1 µM a 37°C durante 20 minutos. El CFSE no unido a las células se eliminó haciéndolo reaccionar durante 5 minutos con un medio de cultivo que tenía un volumen 5 veces mayor de la solución de reacción de tinción y luego centrifugándolo a 1,300 rpm durante 5 minutos. Las PBMC marcadas con CFB se resuspendieron en el medio de cultivo (medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, HEPES 10 mM, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 55 µM, aminoácidos no esenciales 1 mM, y L-glutamina 2 mM), y luego se añadió a una placa de 96 pocillos a  $1 \times 10^5$  células por pocillo.

25 Posteriormente, las PBMC marcadas con CFB se sometieron a tratamiento con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3ε (OKT3, eBioscience, USA) y GI101, GI101C1, GI101C2 o Proleukin (Novartis), y la incubación se realizó en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C durante 7 días. Aquí, las células se sometieron a tratamiento con GI101, GI101C1, GI101C2 e IL-2 a una concentración de 10 µM.

30 Las células incubadas se examinaron para determinar su grado de proliferación midiendo, con análisis FACS usando anticuerpo anti-CD4-PE humano (BioLegend, USA), anticuerpo anti-CD8-PE/Cy7 humano (BioLegend, USA) y anticuerpo anti-FoxP3-APC humano (BioLegend, USA), una proporción de células T CD8+ que no habían sido marcadas con CFSE.

35 Como resultado, los grupos de tratamiento GI101, GI102M61, GI101C2 y Proleukin exhibieron un aumento significativo en la proporción de células T CD8+, en comparación con el grupo de control (sin estímulo), el grupo de tratamiento con anticuerpo anti-CD3 solo y el grupo de tratamiento GI101C1. Además, en comparación con el grupo de control negativo (sin estímulo) y el grupo de tratamiento anti-CD3 solo, los grupos de tratamiento GI101, GI101C2 y Proleukin exhibieron un aumento significativo en la proliferación de células Treg CD4+/FoxP3+, mientras que los grupos de tratamiento GI102 y GI101C1 no mostraron un aumento significativo en la proliferación de células Treg CD4+/FoxP3+ (Fig. 37).

40 **Ejemplo experimental 12. Identificación del efecto de GI101 o GI101w sobre la proliferación de células T CD8+ y células NK**

45 Se dividieron ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad adquiridos en Orient Bio (Busan, Corea) en 3 grupos, cada grupo contenía 3 ratones, y se les inyectó por vía intraperitoneal PBS, GI101 o GI101w. Aquí, se prepararon GI101 y GI101w respectivamente a 40.5 µg en 200 µl de PBS y se inyectaron por vía intraperitoneal. Cinco días después de la inyección, se extrajeron los bazo de los ratones de cada grupo. Las células se aislaron a partir de allí y se midió el número total de células usando un hematocitómetro. Se examinaron los esplenocitos para determinar las proporciones de células T CD8+ y células NK en ellos, con análisis FACS mediante tinción con anticuerpo APC-CD3ε (Biolegend; 145-2C11), anticuerpo PE-NK1.1 (Biolegend; PK136) y anticuerpo Pacific blue-CD8a (BD; 53-6.7). Como tal, se calculó el número de células T CD8+ y células NK presentes en el bazo.

50 Como resultado, se identificó que GI101 activaba la proliferación de células T CD8+ y células NK *in vivo* en comparación con GI101w (Figs. 38 y 39).

**Ejemplo experimental 13. Identificación del efecto de GI101 sobre la función de las células T**

55 Se realizó un experimento utilizando un kit de bioensayo de bloqueo CTLA-4 (Promega Cat. No. JA4005). El experimento se describe brevemente a continuación. Las células efectoras CTLA-4 mantenidas en nitrógeno líquido se descongelaron en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C durante 3 minutos, y se

mezclaron bien 0.8 ml de células efectoras CTLA-4 con 3.2 ml de tampón de ensayo precalentado (90 % RPMI + 10 % FBS). Luego, la mezcla se añadió a una placa de cultivo de glóbulos blancos de 96 pocillos (SPL, Cat. No. 30196) a 25  $\mu$ l por pocillo. Luego, se le añadieron 25  $\mu$ l de GI101 en diversas concentraciones. Para un control negativo, se le añadieron 25  $\mu$ l de tampón de ensayo. Luego, la placa de cultivo celular white plat se cubrió y se colocó a temperatura ambiente hasta que se prepararon células aAPC/Raji.

Las células aAPC/Raji mantenidas en nitrógeno líquido se descongelaron en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C durante 3 minutos, y se mezclaron bien 0.8 ml de células aAPC/Raji con 3.2 ml de tampón de ensayo precalentado. Luego, se añadieron 25  $\mu$ l de la mezcla a la placa por pocillo y se dejó que la reacción prosiguiera en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se dejó reposar el resultante a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se le añadió el reactivo Bio-Glo teniendo cuidado de evitar burbujas. También se añadió el reactivo Bio-Glo a tres de los pocillos más externos y los pocillos se utilizaron como blancos para corregir la señal de fondo. Se dejó que la reacción se desarrollara a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se midió la luminiscencia con Cytaion 3 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). El análisis de los datos finales se realizó calculando RLU (GI101-antecedentes)/RLU (sin tratamiento-antecedentes).

Como resultado, se encontró que GI101 unido a CTLA-4 se expresaba en células T efectoras y activaba la función de las células T en lugar de inhibirlas (Figs. 40 y 41).

#### **Ejemplo experimental 14. Identificación del efecto de mGI101 y mGI102 sobre las células inmunes**

Se dividieron ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad adquiridos en Orient Bio (Corea) en 3 grupos, cada grupo que contenía 3 ratones y se administró por vía intravenosa PBS, 3 mg/kg, 6 mg/kg o 12 mg/kg de GI101, o 3 mg/kg, 6 mg/kg o 12 mg/kg de mGI102 (mGI102-M61). Los días 1, 3, 5, 7 y 14 después de la inyección, se extrajeron los bazos de los ratones de cada grupo. A partir de entonces, para el tejido del bazo, se calcularon los números de células T CD8+ efectoras, células NK y células Treg con análisis FACS utilizando los respectivos anticuerpos, y se calcularon respectivamente las proporciones de células T CD8+ efectoras y células NK con respecto a las células Treg. La información sobre los anticuerpos utilizados en cada ensayo celular es la siguiente:

Células T CD8+ efectoras: Anticuerpo PB anti-CD3ε de ratón (Biolegend, # 155612; KT3.1.1), anticuerpo FITC anti-CD8a de ratón (BD, # 553031, 53-6.7), anticuerpo PE/Cy7 anti-CD44 de ratón (Biolegend, # 103030; IM7), anticuerpo CD122 anti-ratón APC (Biolegend, # 123214; TM-β1)

Células NK: Anticuerpo PB anti-ratón CD3ε (Biolegend, # 155612; KT3.1.1), PE anti-ratón NK-1.1 (Biolegend, # 108708; PK136)

Células Treg: Anticuerpo CD3 anti-ratón FITC (Biolegend, # 100204; 17A2), anticuerpo CD4 anti-ratón PB (Biolegend, # 100531; RM4-5), anticuerpo CD25 anti-ratón PE (Biolegend, # 102008; PC61), anticuerpo anti-CD3 APC anticuerpo Foxp3 de ratón (Invitrogen, No. FJK-16s, 17-5773-82).

Como resultado, el grupo que recibió mGI101 o mGI102 (mGI102-M61) mostró un aumento significativo en el número de células T CD8+ y células NK en los puntos de tiempo de 3 días a 14 días después de la administración, en comparación con el grupo de administración de PBS. Además, se encontró que el grupo que recibió mGI102 exhibió un aumento significativo en las proporciones de células T CD8+ activadas/células Treg y células NK/células Treg en los puntos de tiempo de 3 días a 14 días después de la administración, en comparación con el grupo de administración de PBS (Fig. 42).

#### IV. Identificación del efecto anticancerígeno de la proteína de fusión

#### **Ejemplo experimental 15. Identificación del efecto de GI101 sobre células cancerosas que sobreexpresan PD-L1**

La línea celular cancerosa NC1-H292 que sobreexpresa PD-L1 se cultivó durante 3 horas en un medio de cultivo que contenía 10  $\mu$ g/ml de Mitomicina C (Sigma) y luego se eliminó la Mitomicina C lavando con el medio de cultivo. A partir de entonces, 5  $\times$  10<sup>4</sup> células de la línea celular cancerosa NC1-H292 tratada con Mitomicina C se incubaron con 1  $\times$  10<sup>5</sup> células de PBMC humanas en una placa de 96 pocillos. Aquí, se realizó un tratamiento con 5  $\mu$ g/ml de PHA (Sigma) para la actividad de las células T. Además, se hicieron reaccionar GI101C1 y GI101 a una concentración de 50 nM con IgG1-Fc (Biolegend) o abatacept (= Orenicia; Bristol-Myers Squibb) a una concentración de 50 nM durante 30 minutos a 4°C, y luego el resultante se utilizó para tratar las células cancerosas NC1-H292. Después de 3 días, se recolectó el sobrenadante de la célula incubada y se cuantificó la cantidad de IFN-γ usando un kit ELISA (Biolegend).

Como grupo de control positivo, se utilizaron PBMC humanas estimuladas con PHA en ausencia de la línea celular cancerosa NC1-H292 tratada con Mitomicina C; y como grupo de control negativo, se utilizaron PBMC humanas estimuladas con PHA en presencia de la línea celular cancerosa NC1-H292 tratada con Mitomicina

C. Se llevó a cabo un método experimental utilizando el kit ELISA de IFN- $\gamma$  de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 9.3.

Como resultado, GI101 activó eficazmente la respuesta inmune que había sido inhibida por la línea celular cancerosa que sobreexpresaba PD-L1. Además, se descubrió que GI101 inhibía la señalización de CTLA-4 expresada en células T efectoras (Figs. 43 y 44).

**Ejemplo experimental 16. Identificación del efecto anticancerígeno de GI101 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

Se mezclaron  $5 \times 10^6$  células/0.05 ml de línea celular cancerosa CT-26 derivada de ratón con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y se realizó el trasplante de 0.1 ml de la mezcla mediante administración subcutánea en la región dorsal derecha de ratones BALB/c hembra de 6 semana de edad (Orient Bio). Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se separaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente  $80 \text{ mm}^3$  a  $120 \text{ mm}^3$ . Luego, a los sujetos se les administró por vía intravenosa 0.1 ml de GI101. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración, y se administró PBS a un grupo de control negativo. El tamaño del tumor se midió diariamente para identificar un efecto anticancerígeno.

Como resultado, se observó que los ratones trasplantados con la línea celular cancerosa CT-26 tratados con GI101 exhibieron una disminución notable en el tamaño del tumor en comparación con el grupo de control negativo (Figs. 45 y 46).

**Ejemplo experimental 17. Identificación del efecto anticancerígeno de mGI101 en ratones trasplantados de melanoma derivado de ratón**

Se sometieron ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se mezclaron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa B16F10 (ATCC, USA) con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el alotrasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente  $50 \text{ mm}^3$  a  $120 \text{ mm}^3$ , y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones.

Posteriormente, utilizando una jeringa desecharable (31G, 1 ml), se administró hIgG4 a una dosis de 4 mg/kg a un grupo de control negativo, y se administró un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg a un grupo de control positivo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa mGI101 a una dosis de 1 mg/kg o 4 mg/kg. Además, también se establecieron como grupos experimentales los grupos que habían recibido mGI101 a una dosis de 4 mg/kg y un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente.

Como resultado, el volumen tumoral inicial de todos los grupos fue de  $90 \text{ mm}^3$ , y el error estándar (S.E.) de cada grupo fue de  $5 \text{ mm}^3$  a  $6 \text{ mm}^3$ . En el grupo de control negativo, se observó un cambio en el volumen del tumor durante el período experimental, en el que el volumen del tumor aumentó de  $90 \text{ mm}^3$  hasta  $1,434 \text{ mm}^3$  hasta 15 días después de la administración.

En el grupo que recibió mGI101 en una dosis de 1 mg/kg, se observó que el volumen del tumor aumentó de  $90 \text{ mm}^3$  hasta  $885 \text{ mm}^3$  durante el período experimental, que es el mismo período que el grupo de control negativo, y se observó una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento del tumor en algunos momentos de medición (valor p: 0.5 el día 11, valor de p < 0.01 el día 7, valor de p < 0.001 el día 3). En el grupo que recibió mGI101 en una dosis de 4 mg/kg, se observó que el volumen del tumor aumentó de  $90 \text{ mm}^3$  hasta  $748 \text{ mm}^3$  durante el período experimental, que es el mismo período que el grupo de control negativo, y se observó una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento del tumor en algunos momentos de medición (valor p: 0.5 el día 9, valor p < 0.01 los días 7 y 11).

Además, se analizó la tasa de inhibición del crecimiento tumoral utilizando, como referencia, el grupo que había recibido mlgG a una dosis de 4 mg/kg y comparando este grupo con cada uno de los otros grupos. En el grupo que recibió mGI101 en una dosis de 1 mg/kg, se observó una tasa de inhibición del crecimiento del 36.5 % en comparación con el grupo de control negativo, y no hubo diferencias estadísticamente significativas (valor p: 0.5). En el grupo que recibió mGI101 a una dosis de 4 mg/kg, se obtuvo un resultado estadísticamente significativo (valor p: 0.5) se observó una tasa de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control negativo. Se realizaron un total de dos administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente.

A través de esto, se encontró que en la prueba de eficacia inhibidora del crecimiento tumoral para B16F10, un melanoma alotrasplantado en ratones C57BL/6, mGI101 tenía un efecto de inhibición del crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis (Figs. 47 y 48).

**Ejemplo experimental 18. Identificación del efecto anticancerígeno de mGI101 en ratones trasplantados de células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

Se sometieron ratones BALB/c (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se mezclaron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa CT-26 (ATCC, USA) con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el alotrasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente  $28 \text{ mm}^3$ , y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desechable (31G, 1 ml), se administró hIgG4 a una dosis de 6 mg/kg a un grupo de control negativo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa mGI101 a una dosis de 3 mg/kg, 6 mg/kg o 12 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente.

Como resultado, se encontró que el grupo experimental que recibió mGI101 en una dosis de 6 mg/kg o 12 mg/kg de mGI101 exhibió una inhibición significativa del crecimiento tumoral en algunos momentos de medición y al final de la prueba, en comparación con el grupo de control negativo (Fig. 49). Además, como resultado de la medición de la tasa de supervivencia, se encontró que el grupo experimental que recibió mGI101 en una dosis de 6 mg/kg mostró una mejora significativa en algunos momentos de medición y al final de la prueba, en comparación con el grupo de control negativo (Fig. 50).

**Ejemplo experimental 19. Identificación del efecto anticancerígeno de GI101 en ratones trasplantados con células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

**Ejemplo experimental 19.1. Identificación del efecto inhibidor del tumor**

Se sometieron ratones BALB/c (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se suspendieron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa CT-26 (ATCC, USA) en 0.1 ml de PBS y se realizó un alotrasplante de la suspensión mediante administración subcutánea de 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente  $50 \text{ mm}^3$  a  $200 \text{ mm}^3$ , y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desechable (31G, 1 ml), no se administró ningún fármaco a un grupo de control negativo y se administraron un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg, o un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg por vía intravenosa una dosis de 5 mg/kg y un anticuerpo anti-CTLA-4 a una dosis de 5 mg/kg a los grupos de control positivo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa GI101 a una dosis de 0.1 mg/kg o 1 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente.

Como resultado, en los ratones trasplantados con la línea celular cancerosa CT-26, todos los grupos recibieron anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-CTLA-4, o GI101 en una dosis de 0.1 mg/kg o 1 mg/kg mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral, en comparación con el control negativo. En particular, el grupo experimental que recibió GI101 a una dosis de 0.1 mg/kg mostró un efecto inhibidor del tumor significativo, en comparación con el grupo de tratamiento con anticuerpo anti-PD-1 (\* p < 0.05) (Fig. 51).

**Ejemplo experimental 19.2. Análisis de células inmunes en tejido canceroso**

Los ratones de cada grupo en el Ejemplo Experimental 19.1 se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó un promedio de  $200 \text{ mm}^3$ , y se recogieron tejidos cancerosos. Posteriormente, los tejidos cancerosos se separaron a un nivel unicelular para analizar las células inmunitarias que contenían y luego se realizó un análisis FACS en las células inmunitarias de los tejidos cancerosos utilizando los siguientes anticuerpos: Anti-ratón-CD3 (Biolegend, Cat. No. 100320), Anti-ratón-CD4 (Biolegend, Cat. No. 100526), Anti-ratón-CD8 (Biolegend, Cat. No. 100750), Anti-ratón-FoxP3 (eBioscience, Cat. No. 12-5773-82), Anti-ratón-CD25 (Biolegend, Cat. No. 102049), Anti-ratón-CD44 (eBioscience, Cat. No. 61-0441-82), Anti-ratón-PD-1 (Biolegend, Cat. No. 135218), Anti-ratón-IFN-gamma (Biolegend, Cat. No. 505832), Anti-ratón-CD49b (Biolegend, Cat. No. 108906), Anti-ratón-H2 (Invitrogen, Cat. No. A15443), Anti-ratón-CD11c (Biolegend, Cat. No. 117343), Anti-ratón-CD80 (eBioscience, Cat. No. 47-4801-82), Anti-ratón-CD86 (Biolegend, Cat. No. 104729), Anti-ratón-F4/80 (eBioscience, Cat. No. 47-4801-82), y Anti-ratón-CD206 (eBioscience, Cat. No. 17-2061-80).

Como resultado, el grupo experimental que recibió GI101 en una dosis de 0.1 mg/kg mostró un aumento significativo en las células T CD8+, en comparación con el grupo de control positivo que recibió anticuerpo anti-PD-1 solo en una dosis de 5 mg/kg (\* p < 0.05, Figs. 52 y 53). Además, todos los grupos experimentales que recibieron GI101 mostraron un nivel significativamente mayor de expresión de IFN-γ en células T, en comparación con el grupo de control negativo (\* p < 0.05, Figs. 52 y 53). Además, el grupo experimental que

recibió GI101 en una dosis de 0.1 mg/kg mostró un aumento en los macrófagos M1 en comparación con el grupo de control negativo y el grupo de control positivo que recibió anticuerpo anti-PD-1 solo (Figs. 54 y 55). Además, todos los grupos experimentales que recibieron GI101 mostraron un mayor nivel de expresión de CD86 en macrófagos y células dendríticas (\* p < 0.05, Figs. 54 a 57).

5 **Ejemplo experimental 20. Identificación del efecto anticancerígeno de GI101 en ratones trasplantados con células de cáncer de pulmón derivadas de ratón. Ejemplo experimental 20.1. Identificación del efecto inhibidor del tumor**

Se sometieron ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se suspendieron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa LLC2 (ATCC, USA) en 0.1 ml de PBS y se realizó un alotrasplante de la suspensión mediante administración subcutánea de 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 50 mm<sup>3</sup> a 200 mm<sup>3</sup>, y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desecharable (31G, 1 ml), no se administró ningún fármaco a un grupo de control negativo y se administraron un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg, o un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg por vía intravenosa una dosis de 5 mg/kg y un anticuerpo anti-CTLA-4 a una dosis de 5 mg/kg a los grupos de control positivo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa GI101 a una dosis de 0.1 mg/kg o 1 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente.

Como resultado, todos los grupos experimentales mostraron un efecto inhibidor del tumor significativo, en comparación con el grupo de control negativo (\* p < 0.05) (Fig. 58).

**Ejemplo experimental 20.2. Análisis de células inmunes en tejido canceroso**

Los ratones de cada grupo del Ejemplo Experimental 20.1 se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó un promedio de 200 mm<sup>3</sup> y se recogieron tejidos cancerosos. Posteriormente, se realizó el análisis FACS de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 19.2 para analizar células inmunes en los tejidos cancerosos.

Como resultado, el grupo experimental que recibió GI101 en una dosis de 0.1 mg/kg mostró un aumento significativo en las células T CD8, en comparación con el grupo de control positivo que recibió anticuerpo anti-PD-1 solo (\* p < 0.05, Fig. 59). Además, todos los grupos experimentales que recibieron GI101 mostraron un nivel significativamente mayor de expresión de IFN-γ, en comparación con el grupo de control negativo (\* p < 0.05, Fig. 59). Además, todos los grupos experimentales que recibieron GI101 mostraron un mayor nivel de expresión de CD86 en macrófagos y células dendríticas (\* p < 0.05, Figs. 59 a 61).

**Ejemplo experimental 21. Identificación del efecto anticancerígeno de mGI102-M61 en ratones trasplantados con células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

35 Se sometieron ratones BALB/c (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se mezclaron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa CT-26 (ATCC, USA) con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el alotrasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 28 mm<sup>3</sup>, y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desecharable (31G, 1 ml), se administró hIgG4 a una dosis de 6 mg/kg a un grupo de control negativo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa mGI102-M61 a una dosis de 3 mg/kg, 6 mg/kg o 12 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente.

Como resultado, se identificó que el grupo experimental que recibió mGI102-M61 en una dosis de 12 mg/kg exhibió una inhibición significativa del crecimiento tumoral en algunos momentos de medición y al final de la prueba, en comparación con el grupo de control negativo. (Figura 62). Además, como resultado de medir la tasa de supervivencia, se identificó que el grupo experimental que recibió mGI102-M61 en una dosis de 12 mg/kg mostró una mejora significativa en algunos puntos de tiempo de medición y al final de la prueba, en comparación con el grupo de control negativo (Fig. 63).

**Ejemplo experimental 22. Identificación del efecto anticancerígeno de mGI101 en ratones trasplantados con células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

55 Se sometieron ratones BALB/c (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se mezclaron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa CT-26 (ATCC, USA) con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el alotrasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo

después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 200 mm<sup>3</sup> a 250 mm<sup>3</sup>, y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones.

Posteriormente, utilizando una jeringa desecharable (31G, 1 ml), se administró hIgG4 a una dosis de 4 mg/kg a un grupo de control negativo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa mGI101 a una dosis de 1 mg/kg, 4 mg/kg o 6 mg/kg. Además, los grupos que recibieron mCD80 a 4.9 mg/kg o Fc-IL-2v (GI101C2) a 2.8 mg/kg se establecieron como grupos de control. Además, se estableció como grupo de control un grupo que había recibido simultáneamente mCD80 a 4.9 mg/kg y Fc-IL-2v (GI101C2) a 2.8 mg/kg.

En la medición del volumen del tumor, se identificó que el grupo que recibió mGI101 en una dosis de 6 mg/kg presentó una inhibición significativa en algunos momentos de medición y al final de la prueba, en comparación con el control negativo. Se observó una excelente tasa de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo que recibió una combinación de mCD80 y Fc-IL-2v (GI101C2) (Figs. 64 y 65).

En conclusión, en la prueba de eficacia inhibidora del crecimiento tumoral en ratones BALB/c alotrasplantados con CT-26, una línea celular de cáncer colorrectal derivada de ratón BALB/c, se demostró que la sustancia de prueba mGI101 tenía eficacia inhibidora de tumores en esta condición de prueba en comparación con preparaciones únicas de mCD80 e IL-2v; y se identificó que mGI101 exhibió una excelente eficacia anticancerígena en comparación con el grupo que recibió una combinación de mCD80 e IL-2v (Figs. 64 y 65). En particular, el grupo que recibió mGI101 a una dosis de 6 mg/kg mostró una inhibición significativa del tamaño del tumor, en comparación con el grupo de control negativo y el grupo que recibió una combinación de mCD80 y Fc-IL2v (GI101C2).

#### V. Evaluación de la toxicidad de la proteína de fusión

##### **Ejemplo experimental 23. Evaluación de toxicidad de GI101 en monos**

###### **Ejemplo experimental 23.1. Cría de monos y administración de fármacos**

En el presente experimento, se utilizaron nueve monos filipinos machos (monos Cynomolgus) de 2 a 3 años de edad. El experimento se llevó a cabo de acuerdo con la "Ley sobre bienestar y manejo de animales" de Japón y la "Guía para el cuidado y uso de animales" de Ina Research Inc. El protocolo experimental fue revisado por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC ) de Ina Research Inc, y luego aprobado por AAALAC International (Unidad Acreditada No. 001107).

El experimento se llevó a cabo desde un día antes de la administración del fármaco hasta 15 días después de la administración del fármaco. Se observó a cada mono alrededor de la jaula y además se comprobó el estado de las heces. Los pesos corporales se midieron utilizando una báscula digital (LDS-150H, Shimadzu Corporation) un día antes de la administración del fármaco y los días 1, 8 y 15 después de la administración del fármaco. Además, se midió la cantidad restante de alimento desde un día antes de la administración del fármaco hasta el sacrificio de los monos.

En este caso, se llenó una jeringa desecharable (24G) con el fármaco GI101 y se administraron un total de dos administraciones por vía intravenosa, realizándose cada administración a una tasa de 0.17 ml/seg. GI101 se administró dos veces, con un intervalo de una semana, a una dosis de 5 mg/kg/día o 10 mg/kg/día. A un grupo de control se le administró PBS (pH 7.4) de la misma manera.

###### **Ejemplo experimental 23.2. Observación clínica, identificación de cambios en el peso corporal e ingestión de alimentos**

La observación clínica y la medición de los cambios en el peso corporal y la ingestión de alimentos se realizaron desde un día antes de la administración del fármaco hasta los días 1, 8 y 15 después de la administración del fármaco. Como resultado, GI101 no causó toxicidad (Figs. 66 a 69).

###### **Ejemplo experimental 23.3. Análisis de sangre**

Se recolectó sangre de los monos en el Ejemplo Experimental 23.1 un día antes de la administración del fármaco y los días 1, 8 y 15 después de la administración del fármaco. En este caso, la sangre se recolectó a través de la vena femoral con una jeringa desecharable (22G). La sangre extraída se sometió a análisis de sangre utilizando el Sistema de Hematología Automatizado XN-2000 (Sysmex Corporation) y el Analizador de Coagulación de Sangre Automatizado CA-510 (Sysmex Corporation) para los elementos enumerados en la Tabla 2 a continuación.

[Tabla 2]

Parámetro	Abr.	Unidad	Método	Equipo
-----------	------	--------	--------	--------

Recuento sanguíneo completo				
Recuento de glóbulos rojos	RBC	$10^6/\mu\text{L}$	Detección de flujo envolvente de DC	XN-2000
Concentración de hemoglobina	HGB	g/dL	SLS-hemoglobina	XN-2000
Hematocrito	HCT	%	Detección de altura del pulso RBC	XN-2000
Volumen corpuscular medio	MLV	fL	HCT/RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) X 1000	XN-2000
Hemoglobina corpuscular media	MCH	pg	HGB/RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) X 1000	XN-2000
Concentración de hemoglobina corpuscular media	MCHC	g/dL	HGB/HCT X 100	XN-2000
Recuento de relación de reticulocitos			Citometría de flujo	XN-2000
	RET %	%		
	RET #	$10^9/\text{L}$		
Recuento de plaquetas	PLT	$10^3/\mu\text{L}$	Citometría de flujo	XN-2000
Recuento de glóbulos blancos	WBC	$10^3/\mu\text{L}$	Citometría de flujo	XN-2000
Glóbulos blancos diferenciales	<sup>a)</sup> Recuento de relaciones		Citometría de flujo	XN-2000
	Diff WBC %	%		
	Diff WBC #	$10^3/\mu\text{L}$		
Pruebas de coagulación				
Tiempo de protrombina	PT	s	Detección de dispersión de luz	CA-510
Tiempo de tromboplastina parcial activado	APTT	s	Detección de dispersión de luz	CA-510

<sup>a)</sup> Neutrófilos (NEUT), linfocitos (LYMPH), monocitos (MONO), eosinófilos (EO) y basófilos (BASO)

Como resultado, el grupo que recibió GI101 en una dosis de 5 mg/kg/día o 10 mg/kg/día mostró un aumento en el número de reticulocitos, leucocitos y linfocitos el día 15 (Figs. 70 a 72).

#### Ejemplo experimental 23.4. Análisis clínicos y químicos

- 5 Se recolectó sangre de los monos en el Ejemplo Experimental 23.1 un día antes de la administración del fármaco y los días 1, 8 y 15 después de la administración del fármaco. Aquí, la sangre se recolectó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 23.3. La sangre extraída se sometió a análisis clínico y químico utilizando el analizador clínico modelo 7180 (Hitachi High-Technologies Corporation) para los elementos enumerados en la Tabla 3 a continuación.

10

[Tabla 3]

Parámetro	Abr.	Unidad	Método
Aspartato aminotransferasa	AST	U/L	Método rastreable JSCC
Alanina aminotransferasa	ALT	U/L	Método rastreable JSCC
Fosfatasa alcalina	ALP	U/L	Método rastreable JSCC
Lactato deshidrogenasa	LD	U/L	Método rastreable JSCC

Parámetro	Abr.	Unidad	Método
Creatina quinasa	CK	U/L	Método rastreable JSCC
Glucosa	GLU	mg/dL	Enzimático (Gluc-DH)
Bilirrubina total	BIL	mg/dL	Enzimático (BOD)
Nitrógeno de urea	UN	mg/dL	Enzimático (urease-LEDH)
Creatinina	CRE	mg/dL	Enzimático
Colesterol total	CHO	mg/dL	Enzimático (colesterol oxidasa)
Triglicéridos	TG	mg/dL	Enzimático (GK-GPO con eliminación de glicerol de árbol)
Fosfolípidos	PL	mg/dL	Enzimático (colina oxidasa)
fósforo inorgánico	IP	mg/dL	Enzimático (maltosa fosforilasa)
Calcio	CA	mg/dL	OCPC
Sodio	NA	mEq/L	Electrodo selectivo de iones
Potasio	K	mEq/L	Electrodo selectivo de iones
Cloruro	CL	mEq/L	Electrodo selectivo de iones
Proteína total	TP	g/dL	Biuret
Albúmina	ALB	g/dL	BCG
Relación albúmina-globulina	A/G	-	Calculada
JSCC: Japan Society of Clinical Chemistry			

Como resultado, no se detectó toxicidad causada por GI101 en el análisis clínico y químico (Figs. 73 a 79).

#### Ejemplo experimental 23.5. Análisis de citoquinas

Se recolectó sangre de los monos en el Ejemplo Experimental 23.1 un día antes de la administración del fármaco y los días 1, 8 y 15 después de la administración del fármaco. Aquí, la sangre se recolectó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 23.3. Utilizando el instrumento Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) y el Kit de Ensayo De Panel de Perlas Magnéticas de Citoquinas de Primates No Humanos (EMD Millipore), la sangre extraída se analizó para determinar TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. Como resultado, no se detectó toxicidad causada por GI101 con respecto al análisis de citoquinas (Figs. 80 y 81).

#### Ejemplo experimental 23.6. Análisis de células inmunes.

Se recolectó sangre de los monos en el Ejemplo Experimental 23.1 un día antes de la administración del fármaco y los días 1, 8 y 15 después de la administración del fármaco. Aquí, la sangre se recolectó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 23.3. Usando un citómetro de flujo (LSRFortessa X-20, Becton, Dickinson and Company), se analizó la sangre recolectada para detectar los siguientes elementos:

- 1) Ki67 + CD4: CD45+/CD3+/CD4+/Ki67+

- 2) Ki67 + CD8: CD45+/CD3+/CD8+/Ki67+  
 3) Ki67 + Treg: CD45+/CD3+/FoxP3+/Ki67+  
 4) Ki67 + ICOS + Treg: CD45+/CD3+/FoxP3+/Ki67+/CD278+  
 5) ICOS + Treg: CD45+/CD3+/FoxP3+/CD278+  
 5 6) Ki67 + célula NK: CD45+/CD16+ y CD56+/Ki67+.

Como resultado, en el análisis de células inmunitarias, todos los grupos que recibieron GI101 mostraron, el día 15, un aumento en el número de células T, células T CD4+, células T CD8+, células T reguladoras, células NK y células T Ki67+, células T Ki67+ CD4+, células T Ki67+ CD8+, células T reguladoras Ki67+, células T reguladoras Ki67+ ICOS+, células Ki67+ NK, células T reguladoras ICOS+.

10 Específicamente, en los linfocitos, las proporciones de células T, células T CD4+, células T reguladoras aumentaron y una proporción de células NK disminuyó, mientras que una proporción de células T CD8+ no cambió. Una proporción de células T reguladoras aumentó el día 3 y disminuyó los días 8 y 15. Sin embargo, la proporción seguía siendo mayor que la del grupo de control.

15 Además, con respecto a las proporciones de células inmunitarias, que son Ki67+, en las respectivas células inmunitarias, aumentaron las proporciones de células T Ki67+, células T Ki67+ CD4+, células T Ki67+ CD8+, células T reguladoras Ki67+, células T reguladoras Ki67+ ICOS+, células Ki67+ NK, y células T reguladoras ICOS+.

20 Además, las proporciones de células T Ki67+, células T Ki67+ CD8+, y células Ki67+ NK aumentaron en los días 3, 8, y 15; las proporciones de células T Ki67+ CD4+ y células T reguladoras Ki67+ aumentaron en los días 3 y 8; y las proporciones de células T reguladoras Ki67+ ICOS+ y células T reguladoras ICOS+ aumentaron solo en el día 8 (Figs. 82 a 87).

#### Ejemplo experimental 23.7. Análisis patológico

El día 16, se sacrificaron los monos del Ejemplo Experimental 23.1 y se fijaron todos los órganos y tejidos usando formalina al 10%. Sin embargo, los testículos se fijaron usando una solución de formalina, sacarosa y ácido acético (FSA), y los ojos y el nervio óptico se fijaron usando formaldehído al 1% y glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato. La tinción con hematoxilina-eosina se realizó en los órganos y tejidos de los elementos enumerados en la Tabla 4 a continuación, y las observaciones se realizaron bajo un microscopio óptico.

[Tabla 4]

Órgano/tejido	Fijación	Peso del órgano	Preparación de espécimen	
			Teñido con HE	Nota
Corazón	O	O	-	Músculo papilar del ventrículo izquierdo, pared del ventrículo derecho y áreas que incluyen la arteria coronaria y la válvula aórtica
Aorta (torácica)	O	-		
Esternón	O	-		Descalcificado
Médula ósea esternal		-		
Fémures	O (R&L)	-		Cartílago y diáfisis articular distal; descalcificado
Médula ósea femoral	O (R)	-		Descalcificado
Timo	O	O	O	
Bazo	O	O	O	
Ganglios linfáticos submandibulares	O	-	O	
Ganglios linfáticos mesentéricos	O	-	O	
Tráquea	O	-		Descalcificado

Bronquios	O (R&L)	O (R&L separados)	-	Lóbulos anterior izquierdo y posterior derecho
Pulmones	O	-		
Lengua	O	-		
Glándulas submandibulares	O (R&L)	O (R&L combinadas)		
Glándulas parótidas	O (R&L)	-		
Esófago	O	-		
Estómago	O	-		Cardias, cuerpo y píloro.
Duodeno	O	-		
Yeyuno	O	-		
Íleon	O	-		
parches de Peyer				
Ciego	O	-		
Colon	O	-		
Recto	O	-		
Hígado		O (con vesícula biliar drenada con bilis)	O	
Vesícula biliar	O		O	Lóbulo lateral izquierdo y lóbulo medial derecho, incluida la vesícula biliar.
Páncreas	O	O	-	
Riñones	O (R&L)	O (R&L separados)	O (R&L)	
Vejiga urinaria	O	-		
Pituitaria	O	O		
Tiroides		O (R&L separados)		
Paratiroides	O (R&L)			
Suprarrenales	O (R&L)	O (R&L separados)		
Testículos	O (R&L)	O (R&L separados)		
Epidídimos	O (R&L)	O (R&L separados)		
Próstata	O	O		
Vesículas seminales	O	O	-	
Cerebro	O	O	-	Cerebro (lóbulos frontales, parietal (incluidos los ganglios basales y el hipocampo) y occipital); cerebelo; puente de Varolio; y medula oblonga
Médula espinal (torácica)	O	-		
Nervio ciático	O (L)	-		
Ojos	O (R&L)	-		
Nervios ópticos	O (R&L)	-		
Glándulas lagrimales	O (R&L)	-		
Músculo esquelético (bíceps femoral)	O (L)	-		

Piel (torácica)	O	-		
Lugar de inyección (vena de la cola)	O	-		Descalcificado
Piel de la región torácica o femoral medial con ID No.	O	-	-	

O: realizado -: No realizado

R&L: Se realizaron tanto los órganos/tejidos derechos como los izquierdos.

L: Se realizó tanto el órgano/tejido derecho o izquierdo (usualmente el izquierdo).

R: Se realizó tanto el órgano/tejido derecho o izquierdo (usualmente el derecho).

Como resultado, el grupo tratado con GI101 a una dosis de 5 mg/kg/día o 10 mg/kg/día mostró un aumento en el peso del bazo (Fig. 88). No se observaron cambios significativos en los demás tejidos. En conclusión, en los grupos que recibieron GI101, se observaron algunos cambios pero no se observó toxicidad.

5

#### **VI. Ejemplo experimental 24 para identificar el efecto anticancerígeno de GI102. Identificación del efecto anticancerígeno de GI102-M45.**

**Ejemplo experimental 24.1. Identificación del efecto anticancerígeno de GI102-M45 en ratones trasplantados con células de cáncer colorrectal derivadas de ratón** Se mezclaron  $5 \times 10^6$  células/0.05 ml de línea celular cancerosa CT-26 derivada de ratón con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el trasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de ratones BALB/c hembra de 6 semanas de edad (Orient Bio). Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se separaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 80 mm<sup>3</sup> hasta 120 mm<sup>3</sup>. Luego, a los sujetos se les administró por vía intravenosa 0.1 ml de GI102-M45. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración y se administró PBS como control negativo. El tamaño del tumor se midió diariamente para identificar un efecto anticancerígeno. La actividad de GI102-M45 se identificó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 16.

#### **Ejemplo experimental 24.2. Identificación del efecto anticancerígeno de G1102-M45 en ratones trasplantados con células pulmonares derivadas de ratón**

Se sometieron ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se suspendieron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa LLC2 (ATCC, USA) en 0.1 ml de PBS y se realizó un alotrasplante de la suspensión mediante administración subcutánea de 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 50 mm<sup>3</sup> a 200 mm<sup>3</sup>, y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desechable (31G, 1 ml), no se administró ningún fármaco a un grupo de control negativo y se administraron un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg, o un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg por vía intravenosa una dosis de 5 mg/kg y un anticuerpo anti-CTLA-4 a una dosis de 5 mg/kg a los grupos de control positivo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa GI102-M45 a una dosis de 0.1 mg/kg o 1 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente. La actividad de GI102-M45 se identificó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 20.1.

#### **Ejemplo experimental 25. Identificación del efecto anticancerígeno de GI102-M61.**

#### **Ejemplo experimental 25.1. Identificación del efecto anticancerígeno de GI102-M61 en ratones trasplantados con células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

Se mezclaron  $5 \times 10^6$  células /0.05 ml de línea celular cancerosa CT-26 derivada de ratón con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el trasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de ratones BALB/c hembra de 6 semanas de edad (Orient Bio). Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se separaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 80 mm<sup>3</sup> a 120 mm<sup>3</sup>. Luego, a los sujetos se les administró por vía intravenosa 0.1 ml de GI102-M61. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración y se administró PBS a un control negativo. El tamaño del tumor se midió

diariamente para identificar un efecto anticancerígeno. La actividad de GI102-M61 se identificó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 16.

**Ejemplo experimental 25.2. Identificación del efecto antitumoral de G1102-M61 en ratones trasplantados con células de cáncer de pulmón derivadas de ratón**

5 Se sometieron ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se suspendieron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa LLC2 (ATCC, USA) en 0.1 ml de PBS y se realizó un alotrasplante de la suspensión mediante administración subcutánea de 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente  
10 50 mm<sup>3</sup> a 200 mm<sup>3</sup>, y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desechable (31G, 1 ml), no se administró ningún fármaco a un grupo de control negativo, y se administraron un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg, o un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg por vía intravenosa una dosis de 5 mg/kg y un anticuerpo anti-CTLA-4 a una dosis de 5 mg/kg a los grupos de control positivo. Para los grupos  
15 experimentales, se administró a los mismos por vía intravenosa GI102-M61 a una dosis de 0.1 mg/kg o 1 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente. La actividad de GI102-M61 se identificó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 20.1.

**Ejemplo experimental 26. Identificación del efecto anticancerígeno de GI102-M72.**

20 **Ejemplo experimental 26.1. Identificación del efecto antitumoral de GI102-M72 en ratones trasplantados con células de cáncer colorrectal derivadas de ratón**

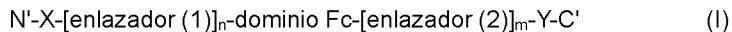
Se mezclaron  $5 \times 10^6$  células/0.05 ml de línea celular cancerosa CT-26 derivada de ratón con 0.05 ml de matriz Matrigel libre de rojo fenol (BD), y el trasplante de la mezcla se realizó mediante administración subcutánea a 0.1 ml en la región dorsal derecha de ratones BALB/c hembra de 6 semanas de edad (Orient Bio). Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se separaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 80 mm<sup>3</sup> a 120 mm<sup>3</sup>. Luego, a los sujetos se les administró por vía intravenosa 0.1 ml de GI102-M72. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración y se administró PBS a un control negativo. El tamaño del tumor se midió diariamente para identificar un efecto anticancerígeno. La actividad de GI102-M72 se identificó de la misma  
25 manera que en el Ejemplo Experimental 16.

**Ejemplo experimental 26.2. Identificación del efecto anticancerígeno de G1102-M72 en ratones trasplantados con células de cáncer de pulmón de ratón**

30 Se sometieron ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad) adquiridos de Orient Bio a un período de aclimatación de 7 días. Entonces, se suspendieron  $5 \times 10^6$  células de la línea celular cancerosa LLC2 (ATCC, USA) en 0.1 ml de PBS y se realizó un alotrasplante de la suspensión mediante administración subcutánea de 0.1 ml en la región dorsal derecha de los ratones. Un cierto período de tiempo después del trasplante de células cancerosas, se midió el volumen del tumor y se seleccionaron los sujetos que alcanzaron aproximadamente 50 mm<sup>3</sup> a 200 mm<sup>3</sup>, y luego los ratones seleccionados se agruparon uniformemente según el tamaño del tumor y el peso corporal, cada grupo contenía 10 ratones. Posteriormente, utilizando una jeringa desechable (31G, 1 ml), no se administró ningún fármaco a un grupo de control negativo, y se administraron un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg, o un anticuerpo anti-PD-1 a una dosis de 5 mg/kg por vía intravenosa una dosis de 5 mg/kg y un anticuerpo anti-CTLA-4 a una dosis de 5 mg/kg a los grupos de control positivo. Para los grupos experimentales, se les administró por vía intravenosa GI102-M72 a una dosis de 0.1 mg/kg o 1 mg/kg. Se realizaron un total de tres administraciones una vez cada tres días después de la primera administración. El tamaño del tumor se midió diariamente. La actividad de GI102-M72 se identificó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 20.1.

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende una proteína variante de IL-2 y un fragmento de CD80, en la que la proteína de fusión consiste en la siguiente fórmula estructural (I):



5 en la fórmula estructural (I),

N' es el N-terminal de la proteína de fusión,

C' es el C-terminal de la proteína de fusión,

X es el fragmento CD80,

10 en donde el fragmento CD80 consiste en el 35º aminoácido al 242º aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

Y es la proteína variante de IL-2,

en donde la variante de IL-2 se obtiene mediante sustitución de al menos una seleccionada de los aminoácidos 38º, 42º, 45º, 61º, y 72º en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,

los enlazadores (1) y (2) son enlazadores peptídicos, y

15 n y m son cada uno independientemente 0 o 1.

2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la variante de IL-2 se obtiene mediante al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

20 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la variante de IL-2 contiene una cualquiera seleccionada de las siguientes combinaciones de sustitución (a) a (d) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10:

(a) R38A/F42A

(b) R38A/F42A/Y45A

(c) R38A/F42A/E61R

25 (d) R38A/F42A/L72G.

4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la variante de IL-2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 22, 23 o 24.

5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el dominio Fc es un tipo salvaje o una variante, preferiblemente en donde la variante del dominio Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

30 6. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el dominio Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el enlazador (1) consiste en 5 a 80 aminoácidos contiguos y el enlazador (2) consiste en 1 a 50 aminoácidos contiguos.

35 8. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el enlazador (1) es un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o el enlazador (2) es un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

9. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 26, 28 o 30.

40 10. Un dímero de proteína de fusión en donde dos proteínas de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 están unidas entre sí, preferiblemente en donde el dímero de proteína de fusión es un homodímero.

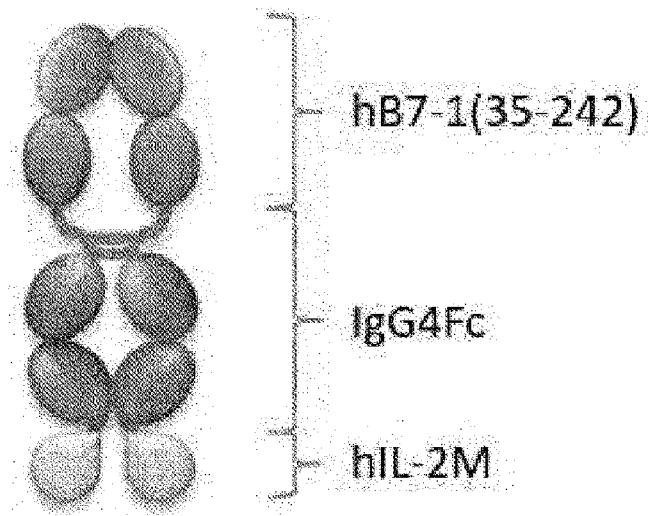
11. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. El polinucleótido de la reivindicación 11, en donde el polinucleótido tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, 25, 27 o 29.

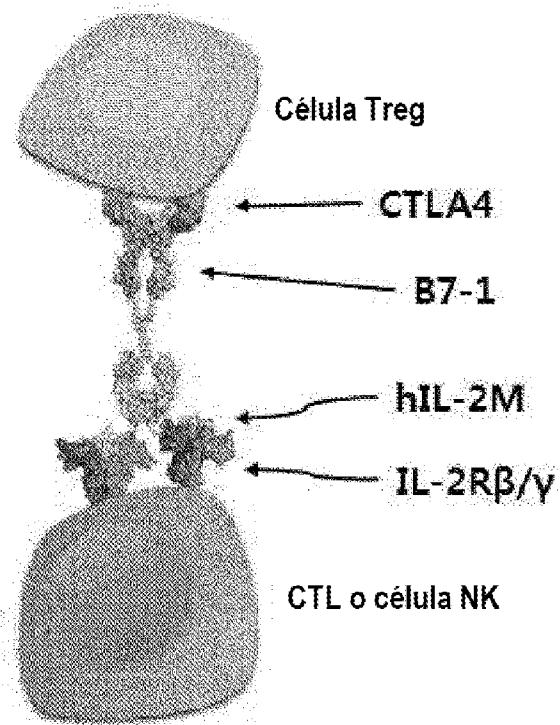
13. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12.

14. Una célula transformada en donde se ha introducido el vector de la reivindicación 13.
15. Una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde la composición farmacéutica comprende como un ingrediente activo:
  - la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; o
  - el dímero de proteína de fusión de la reivindicación 10.
16. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
17. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el cáncer es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia mieloide aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma.
18. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la enfermedad infecciosa es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B, hepatitis C, infección por el virus del papiloma humano, infección por citomegalovirus, enfermedad respiratoria viral, e influenza.
19. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el dímero de proteína de fusión de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa.

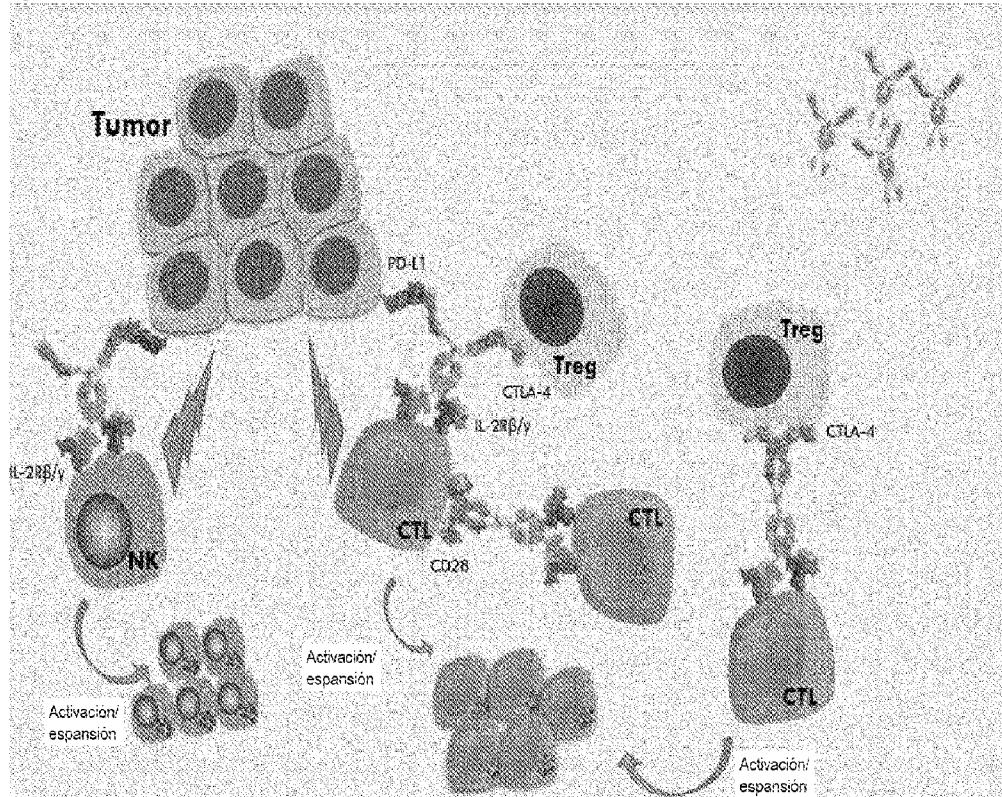
[Fig. 1]



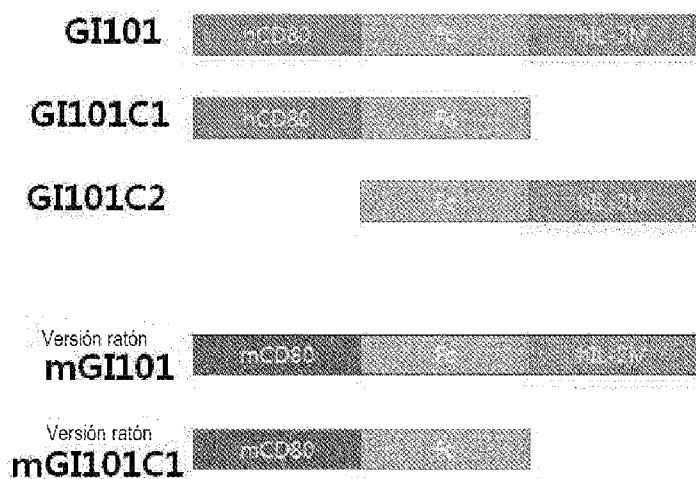
[Fig. 2]



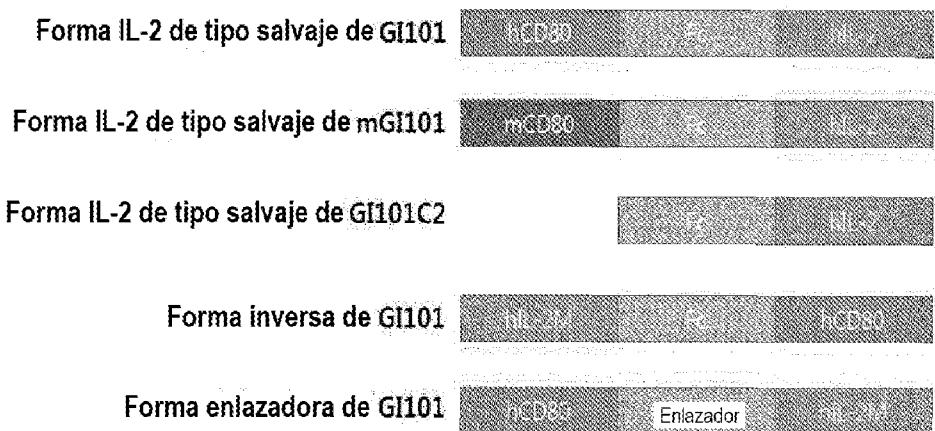
[Fig. 3]



[Fig. 4]

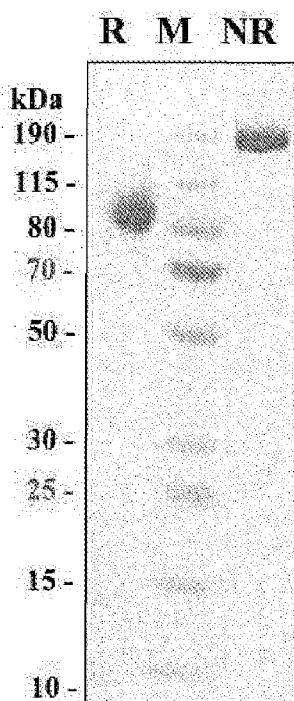


[Fig. 5]



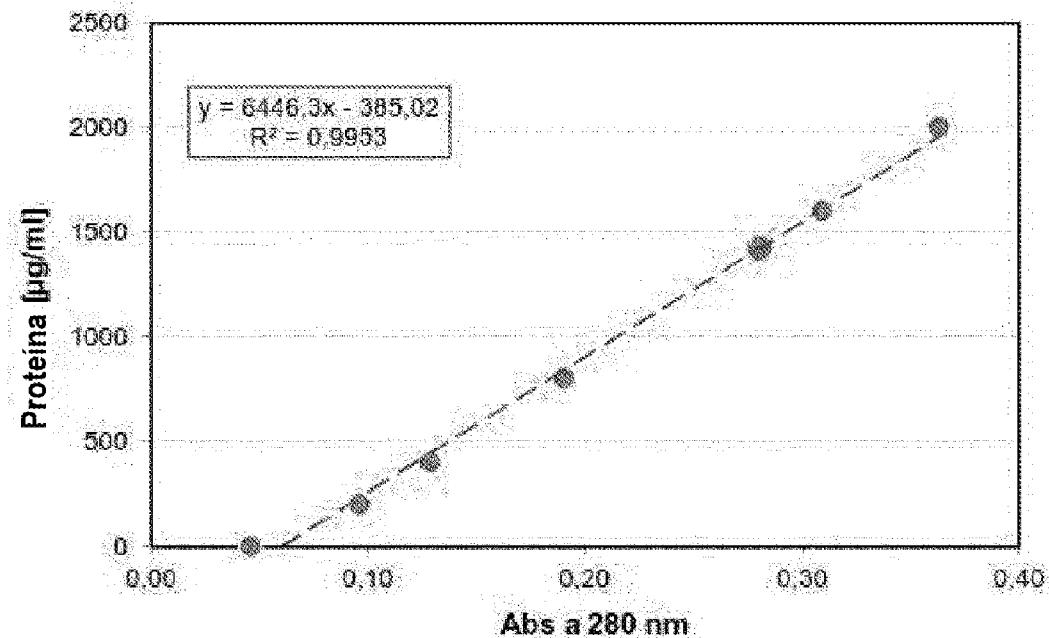
[Fig. 6]

**SDS-PAGE**



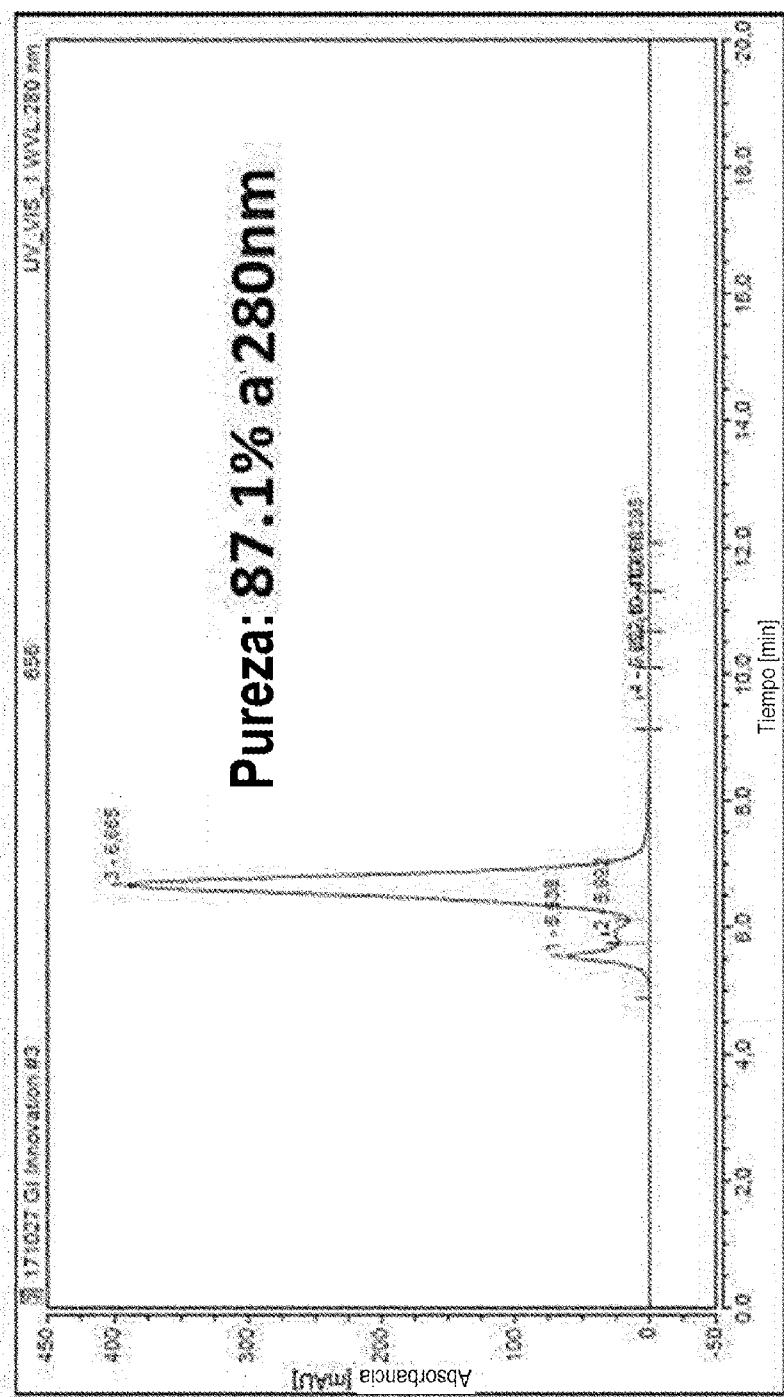
# ES 2 985 387 T3

[Fig. 7]

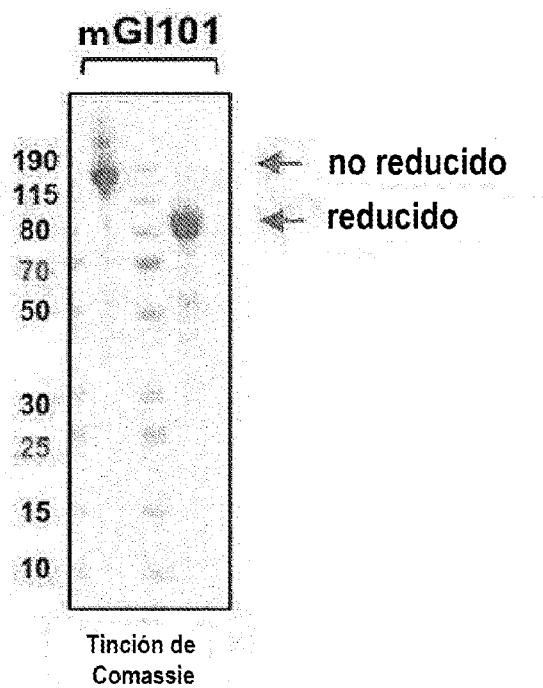


[Fig. 8]

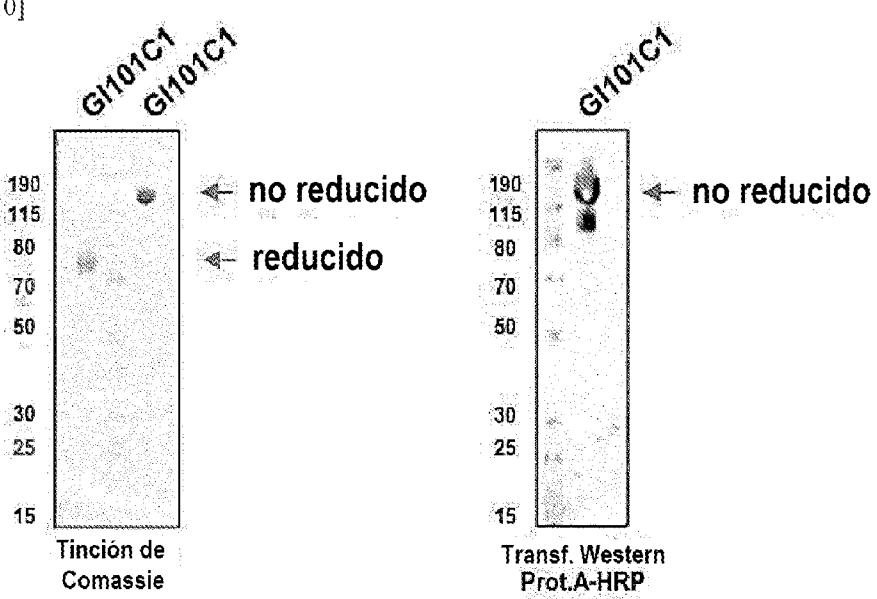
### Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC)



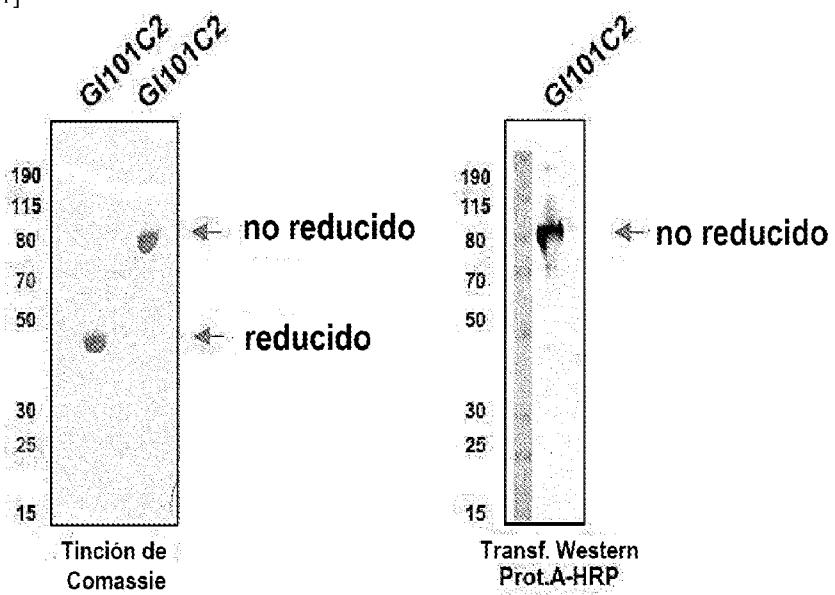
[Fig. 9]



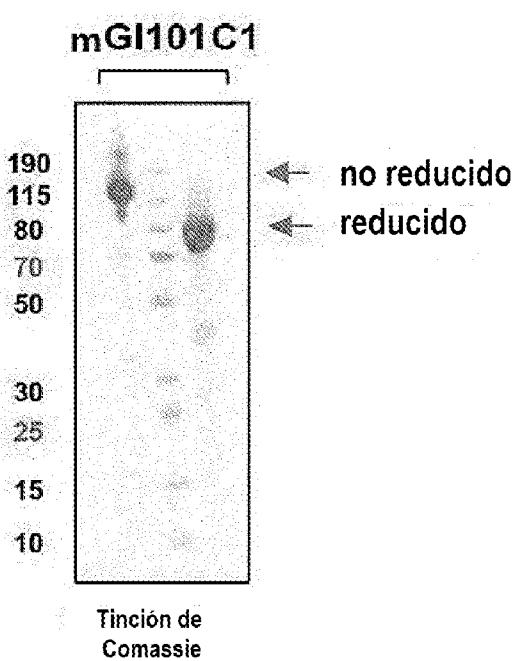
[Fig. 10]



[Fig. 11]

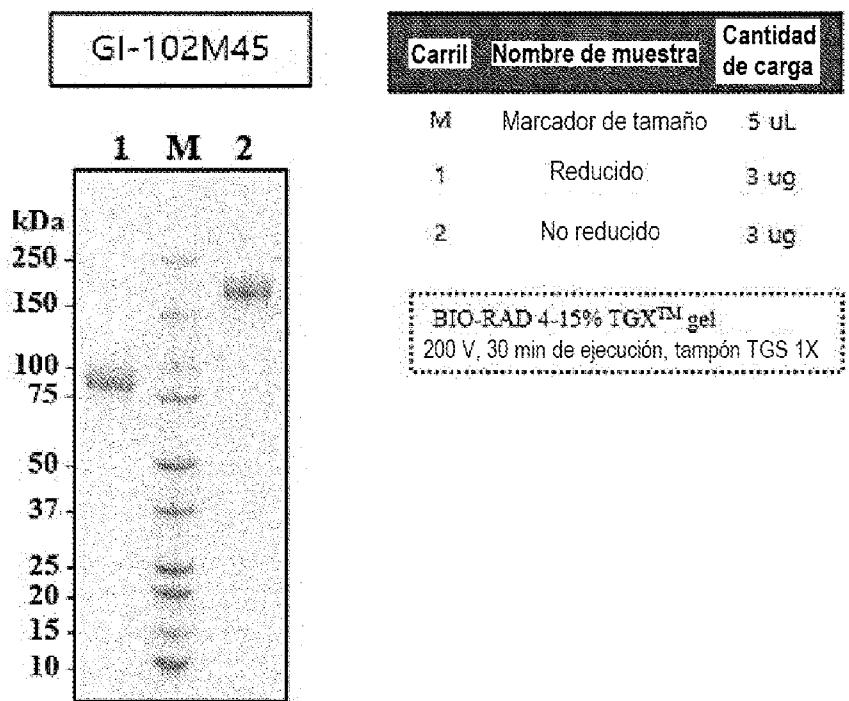


[Fig. 12]

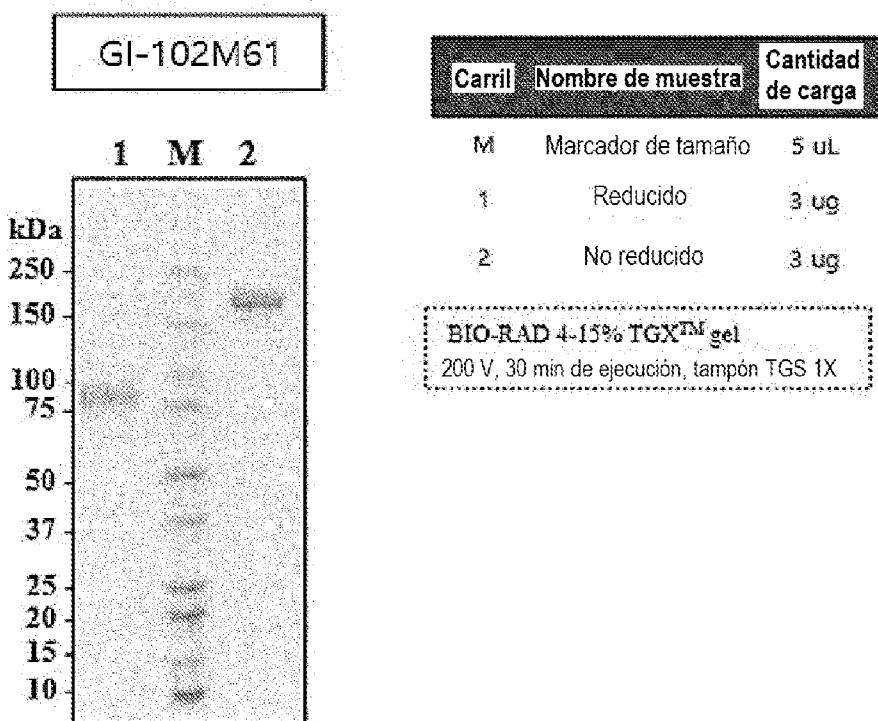


# ES 2 985 387 T3

[Fig. 13]

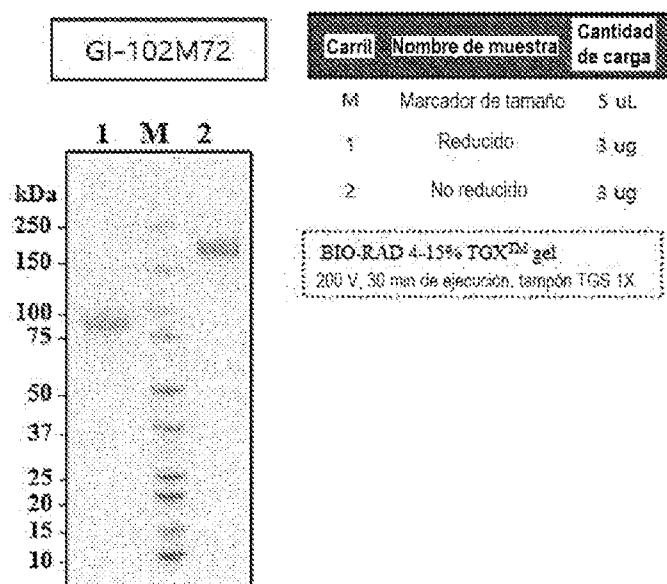


[Fig. 14]

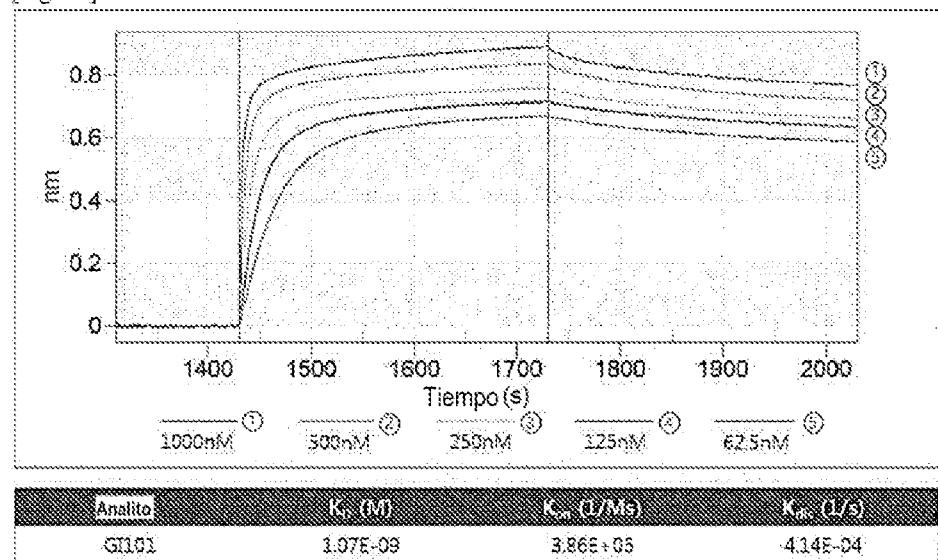


# ES 2 985 387 T3

[Fig. 15]

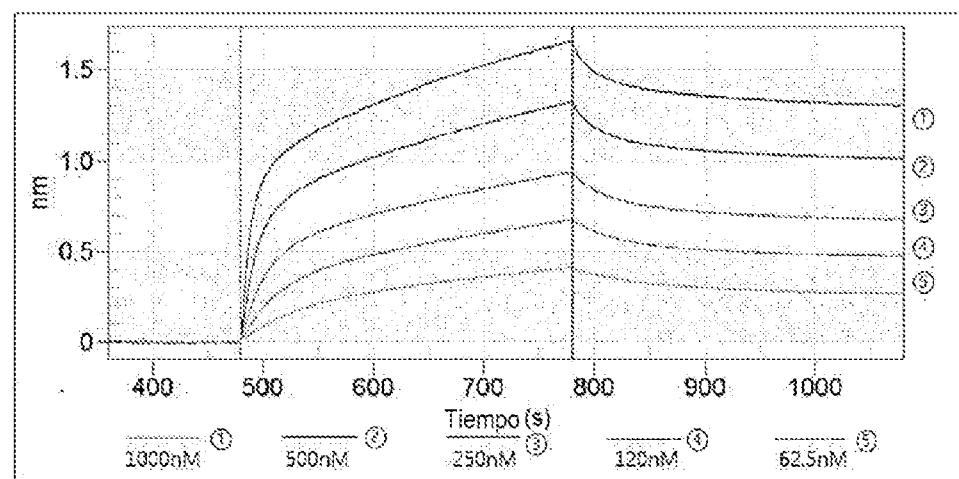


[Fig. 16]



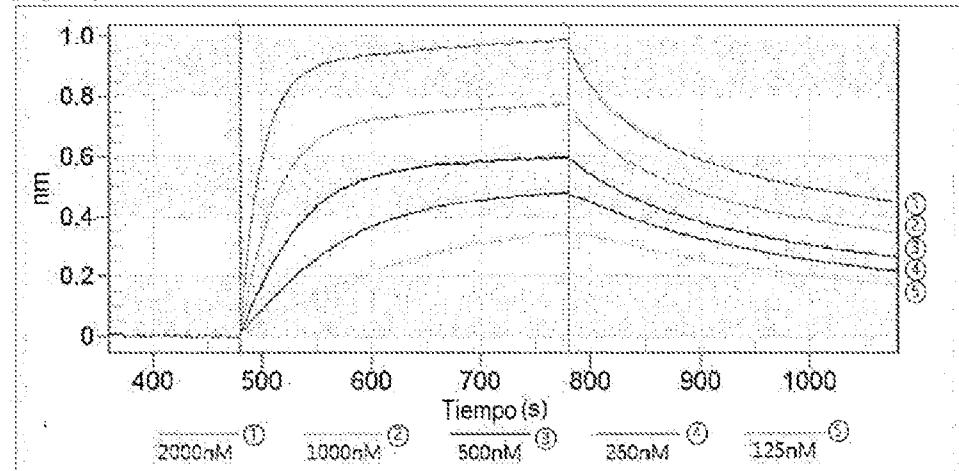
# ES 2 985 387 T3

[Fig. 17]



Analito	$K_{d1}$ (M)	$K_{d2}$ (1/Ms)	$K_{d3}$ (1/s)
GI101	3.46E-08	7.05E+04	3.42E-03

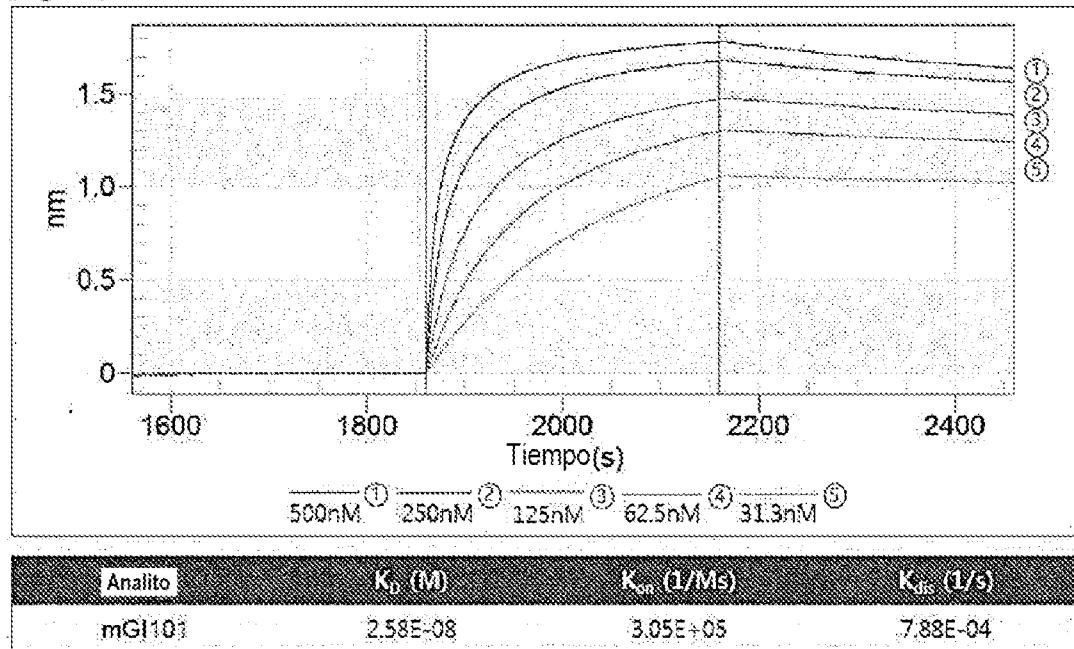
[Fig. 18]



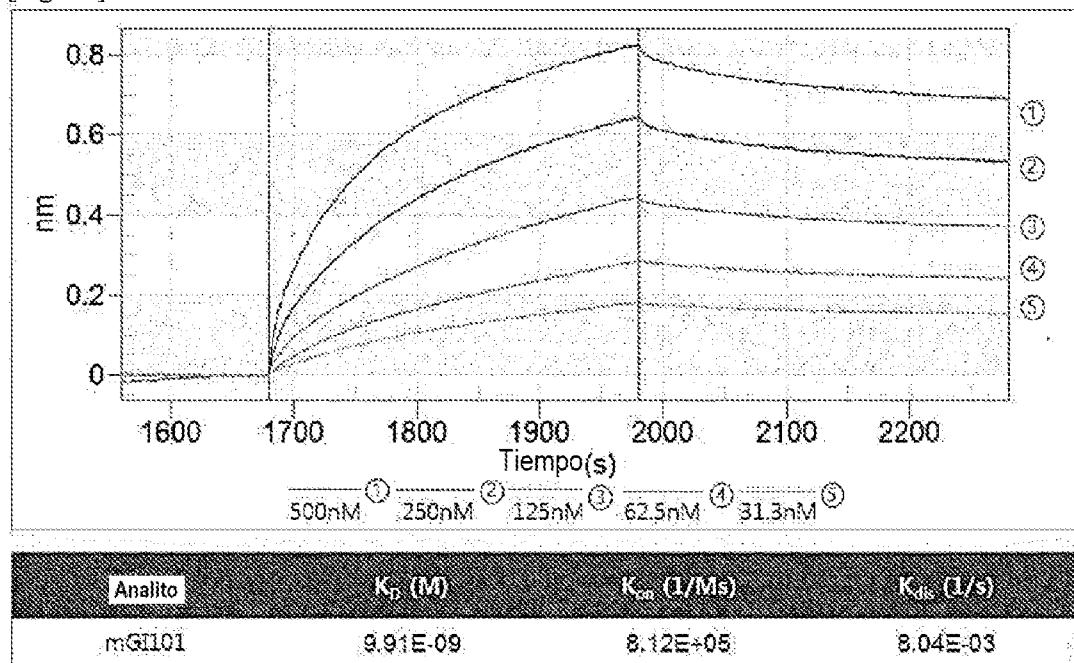
Analito	$K_{d1}$ (M)	$K_{d2}$ (1/Ms)	$K_{d3}$ (1/s)
PD-1	1.13E-07	3.72E+04	3.07E-03

# ES 2 985 387 T3

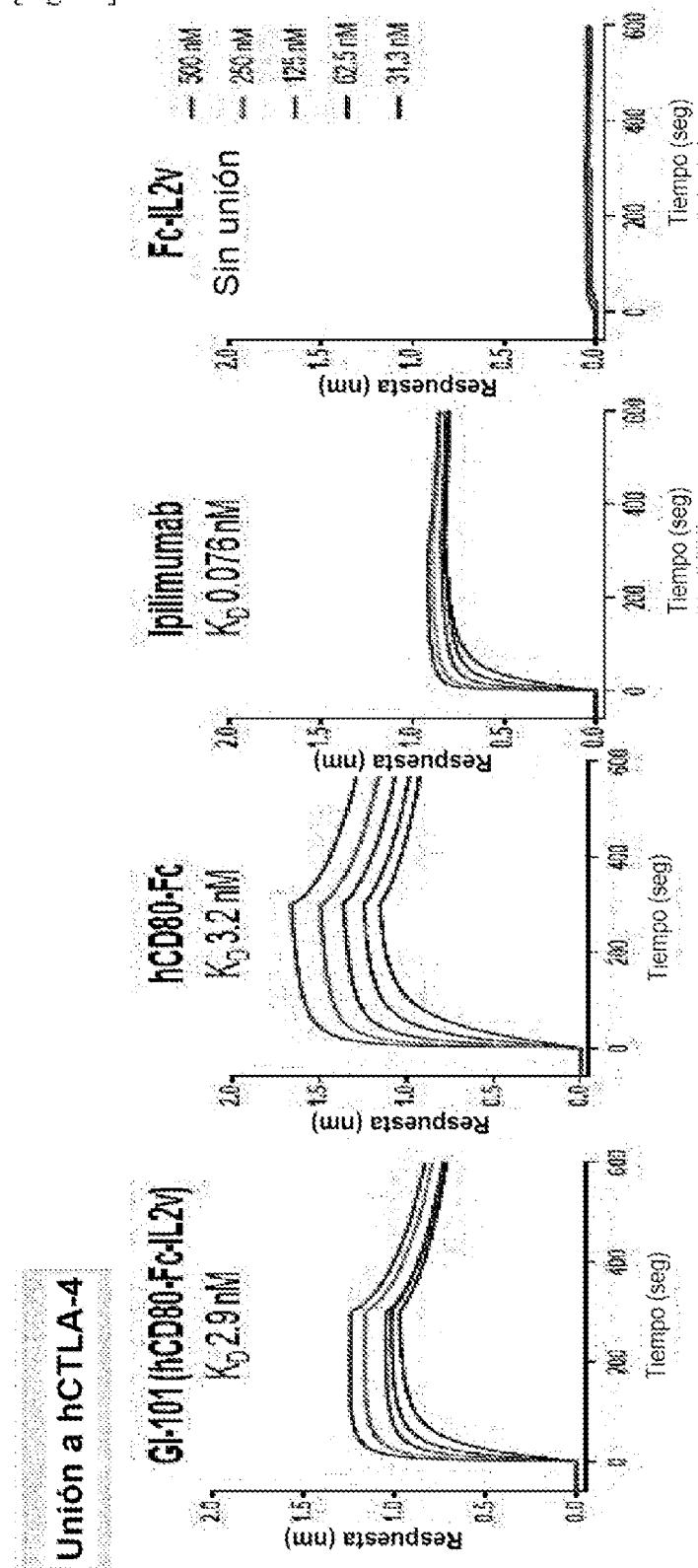
[Fig. 19]



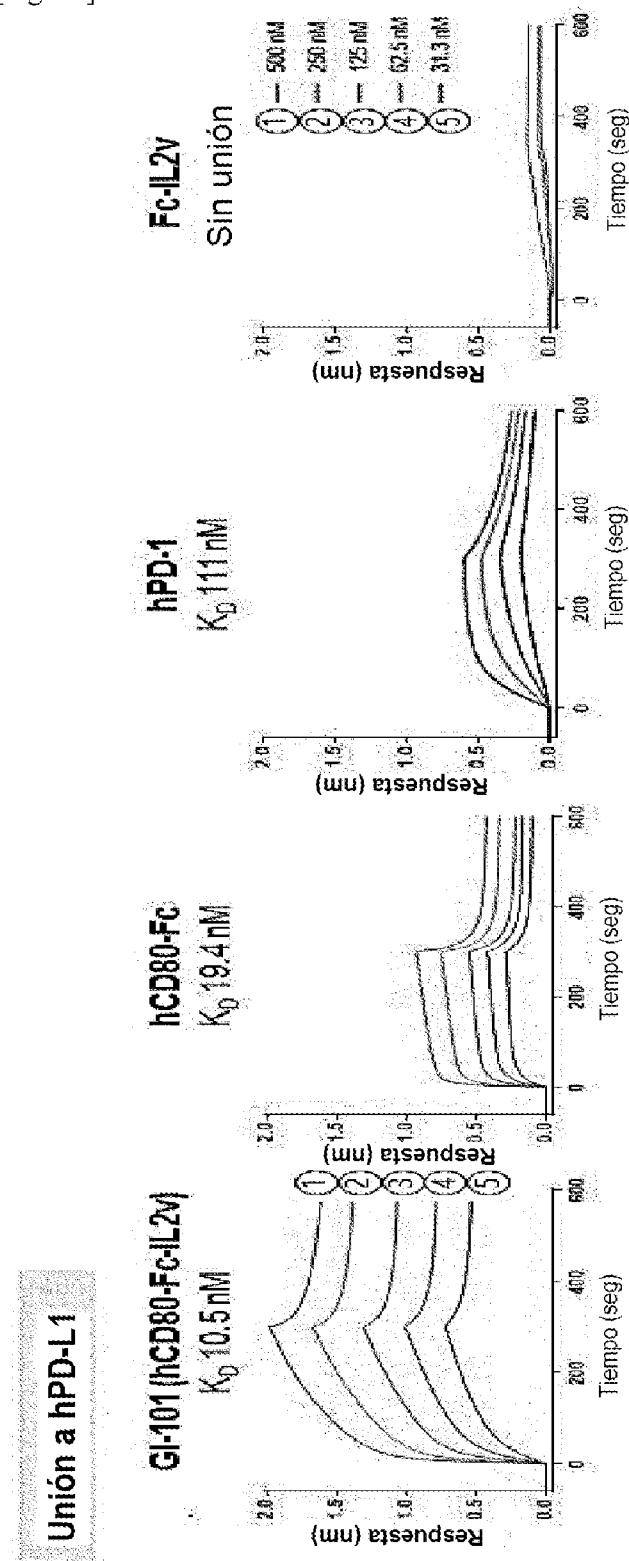
[Fig. 20]



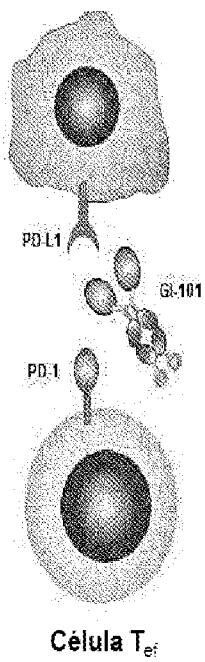
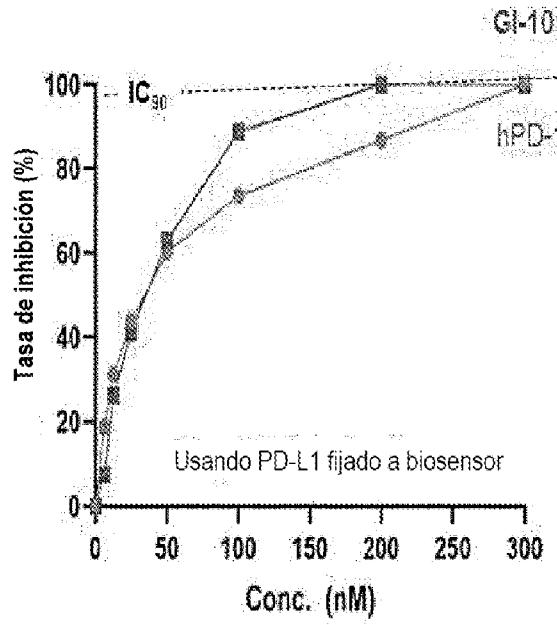
[Fig. 21]



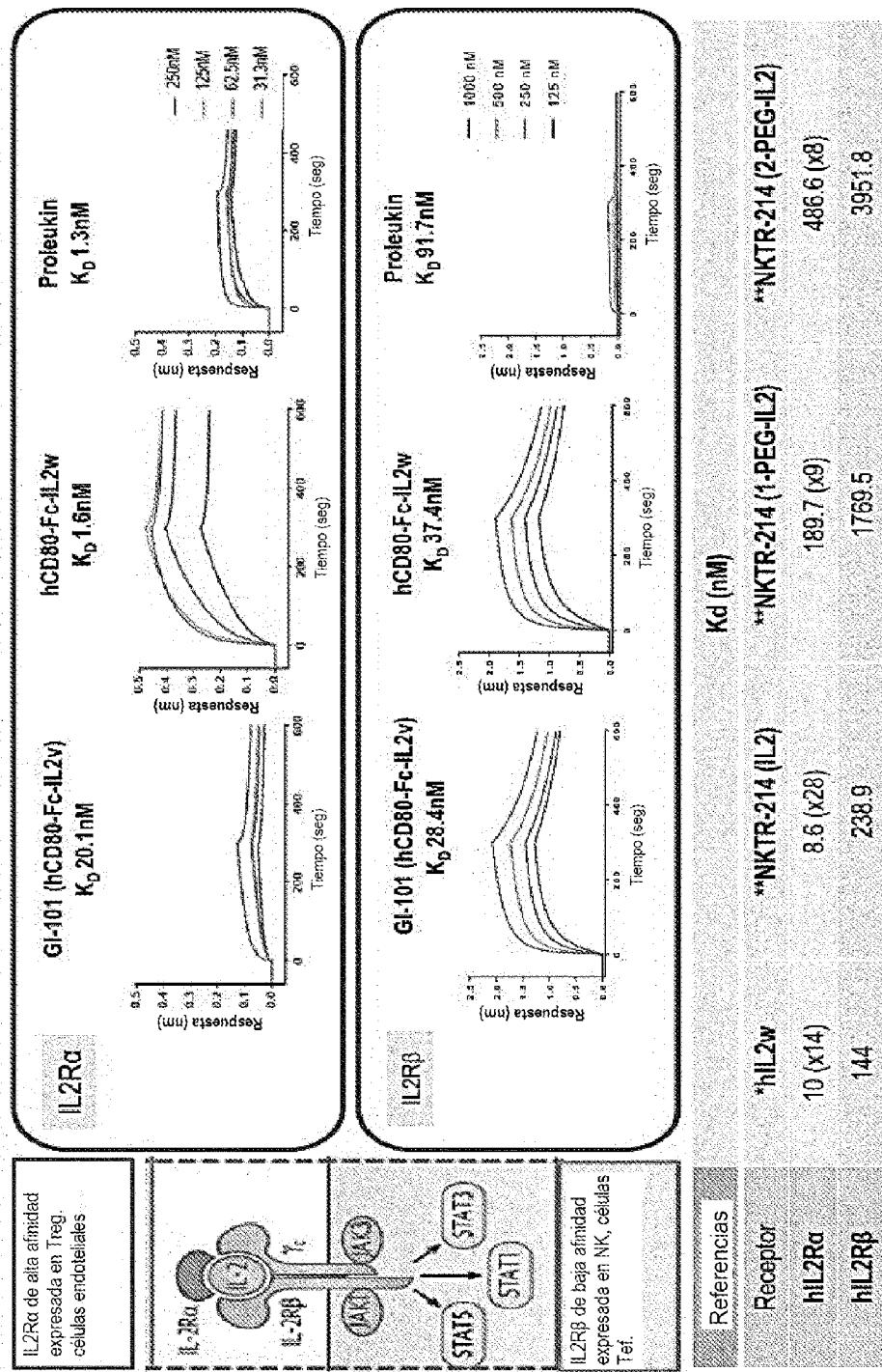
[Fig. 22]



[Fig. 23]

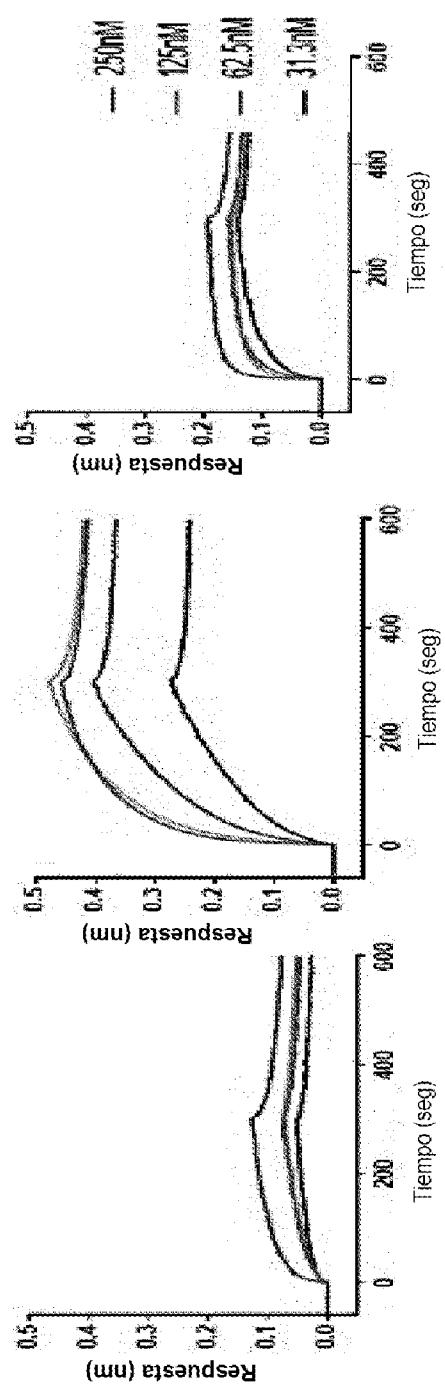
**Célula tumoral****La dosis de GI-101 inhibe de forma dependiente las interacciones PD-1/PD-L1**

[Fig. 24]

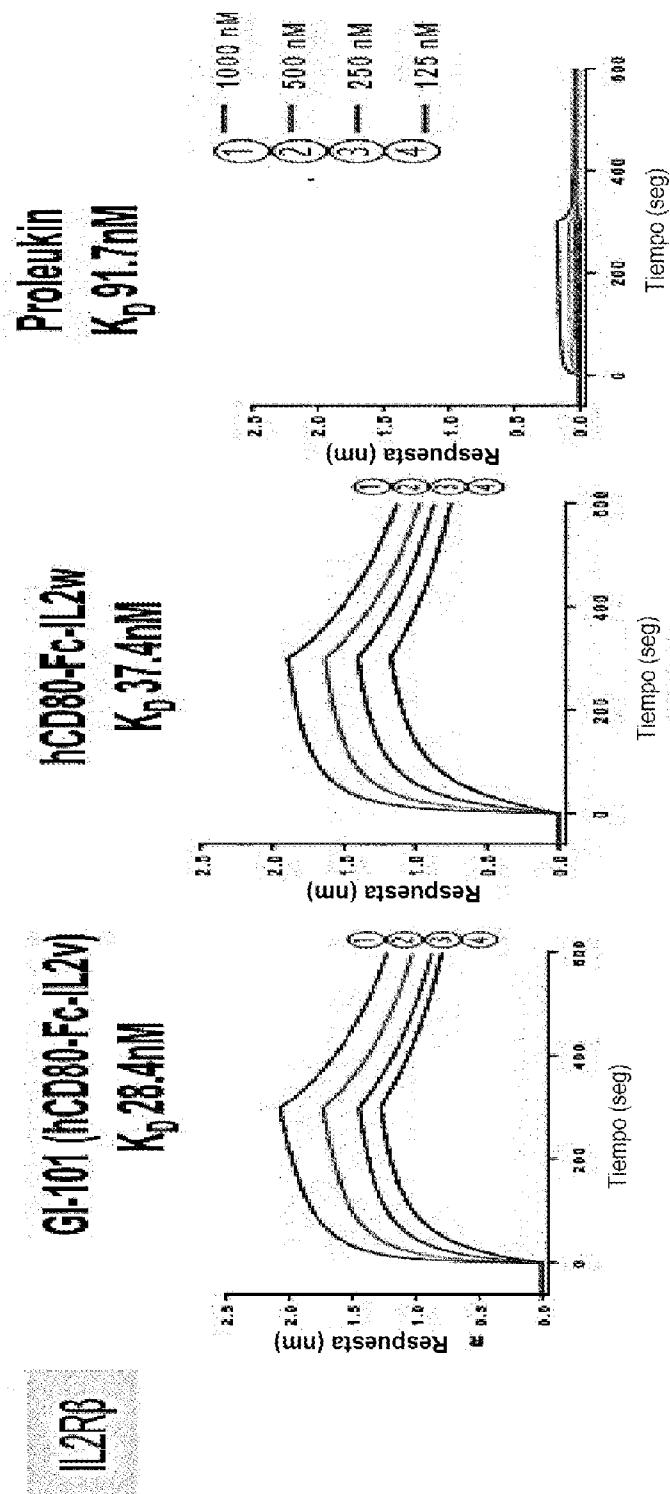


[Fig. 25]

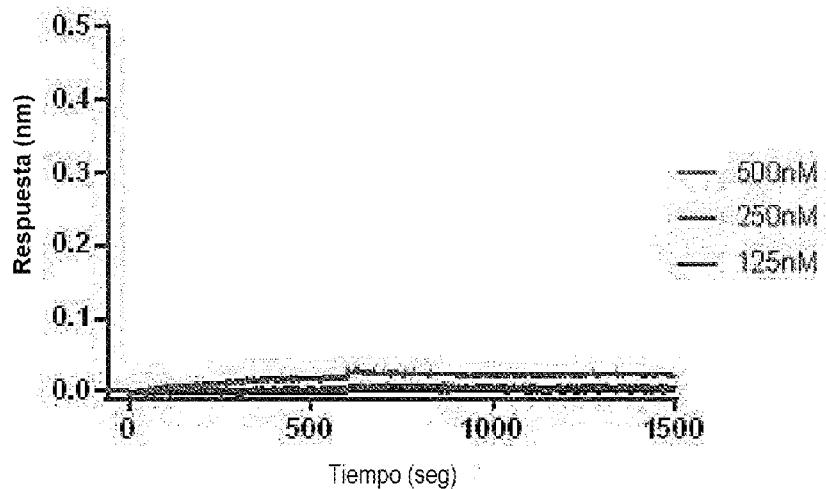
**Proleukin**  
 $K_D$  1.3nM  
**hCD80-Fc||IL2R**  
 $K_D$  1.6nM  
**G1-101 (hCD80-Fc||IL2R)**  
 $K_D$  20.1nM  
**IL2Rg**



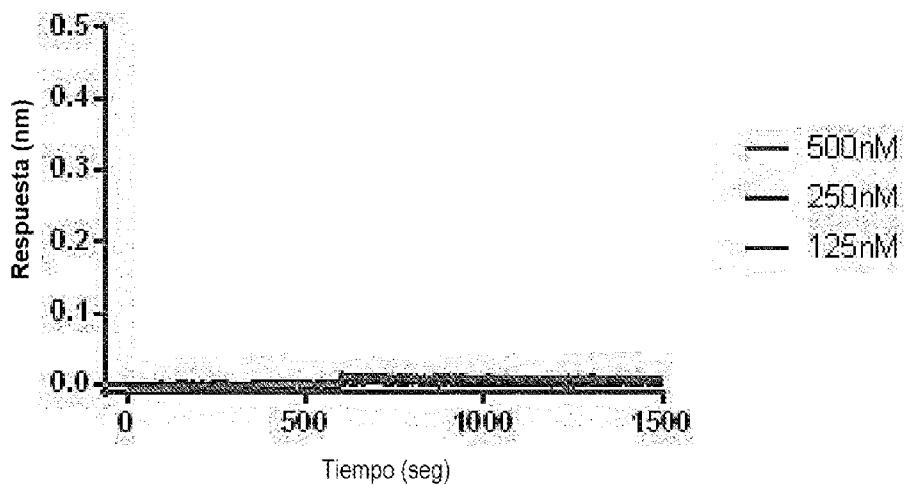
[Fig. 26]



[Fig. 27]

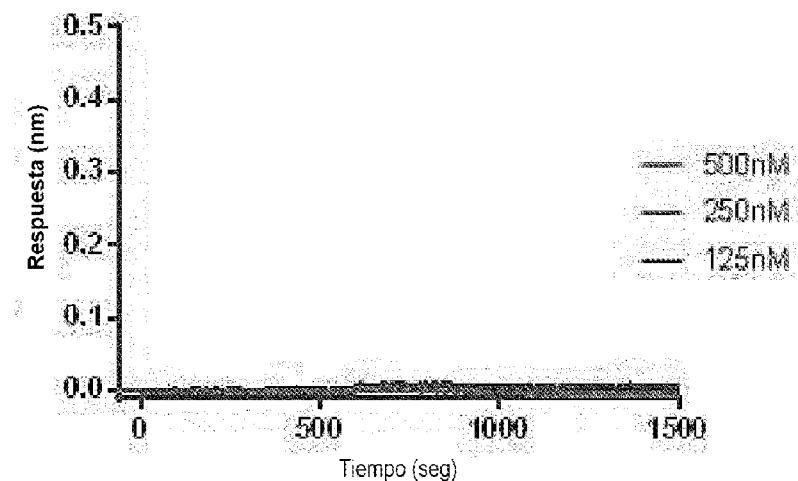


[Fig. 28]

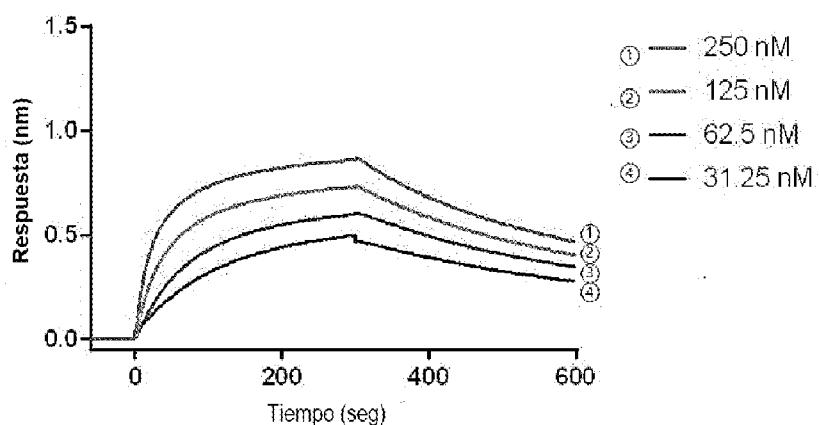


# ES 2 985 387 T3

[Fig. 29]



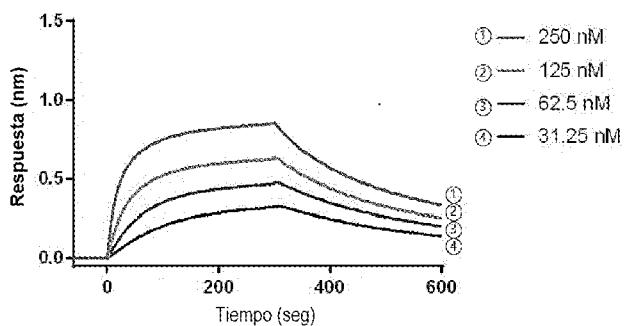
[Fig. 30]



Kactivo	Kinactivo	Kd
1.30X10 <sup>5</sup>	2.01X10 <sup>-3</sup>	1.55X10 <sup>-8</sup>

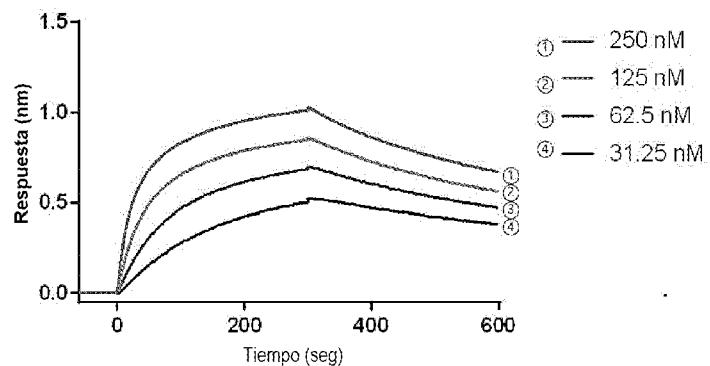
# ES 2 985 387 T3

[Fig. 31]



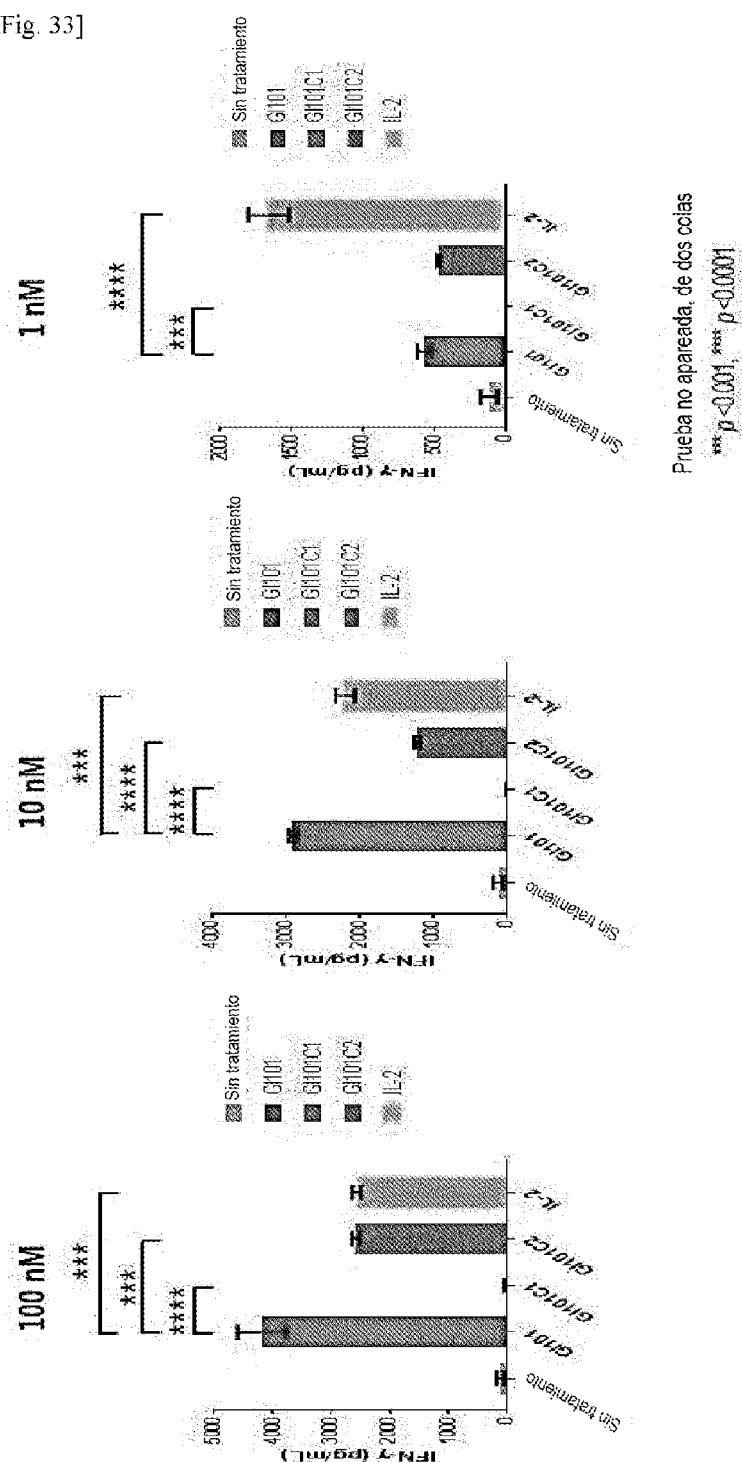
Kactivo	Kinactivo	Kd
$1.32 \times 10^5$	$3.11 \times 10^{-3}$	$2.36 \times 10^{-8}$

[Fig. 32]



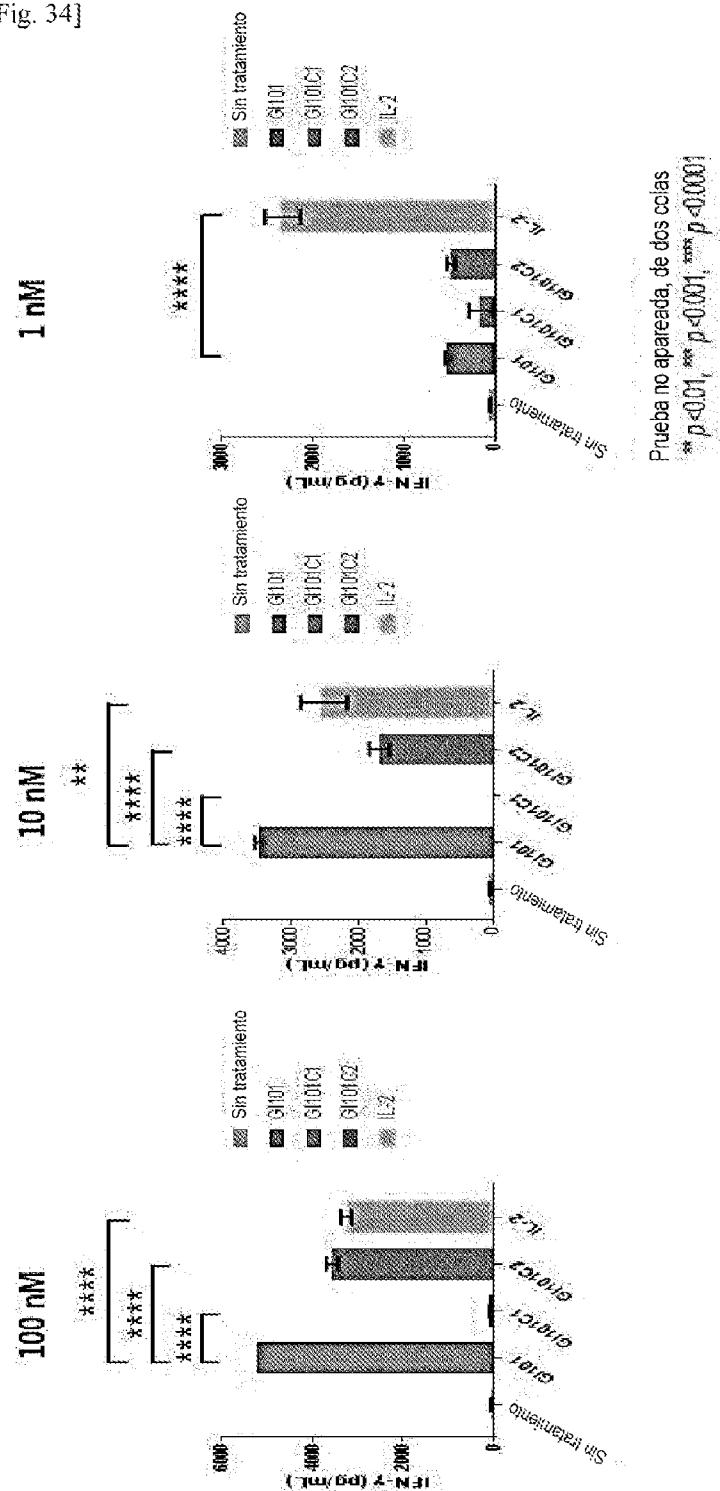
Kactivo	Kinactivo	Kd
$1.10 \times 10^5$	$1.27 \times 10^{-3}$	$1.15 \times 10^{-8}$

[Fig. 33]

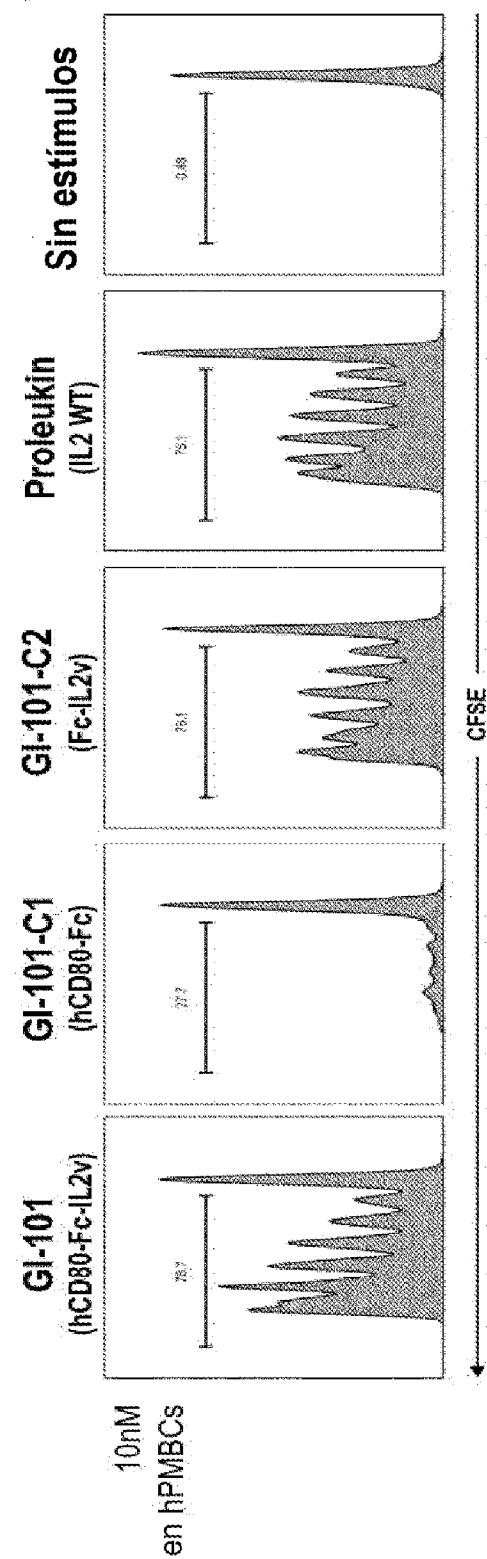


# ES 2 985 387 T3

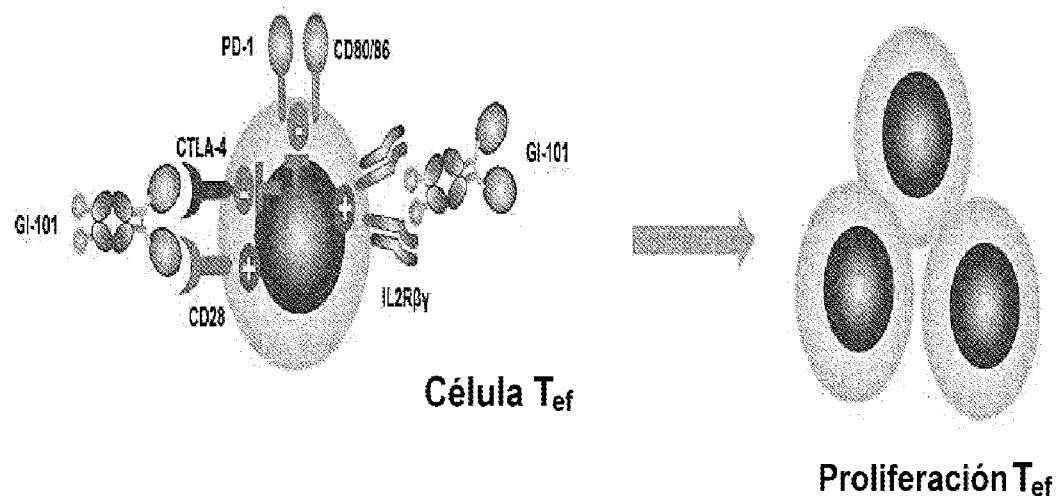
[Fig. 34]



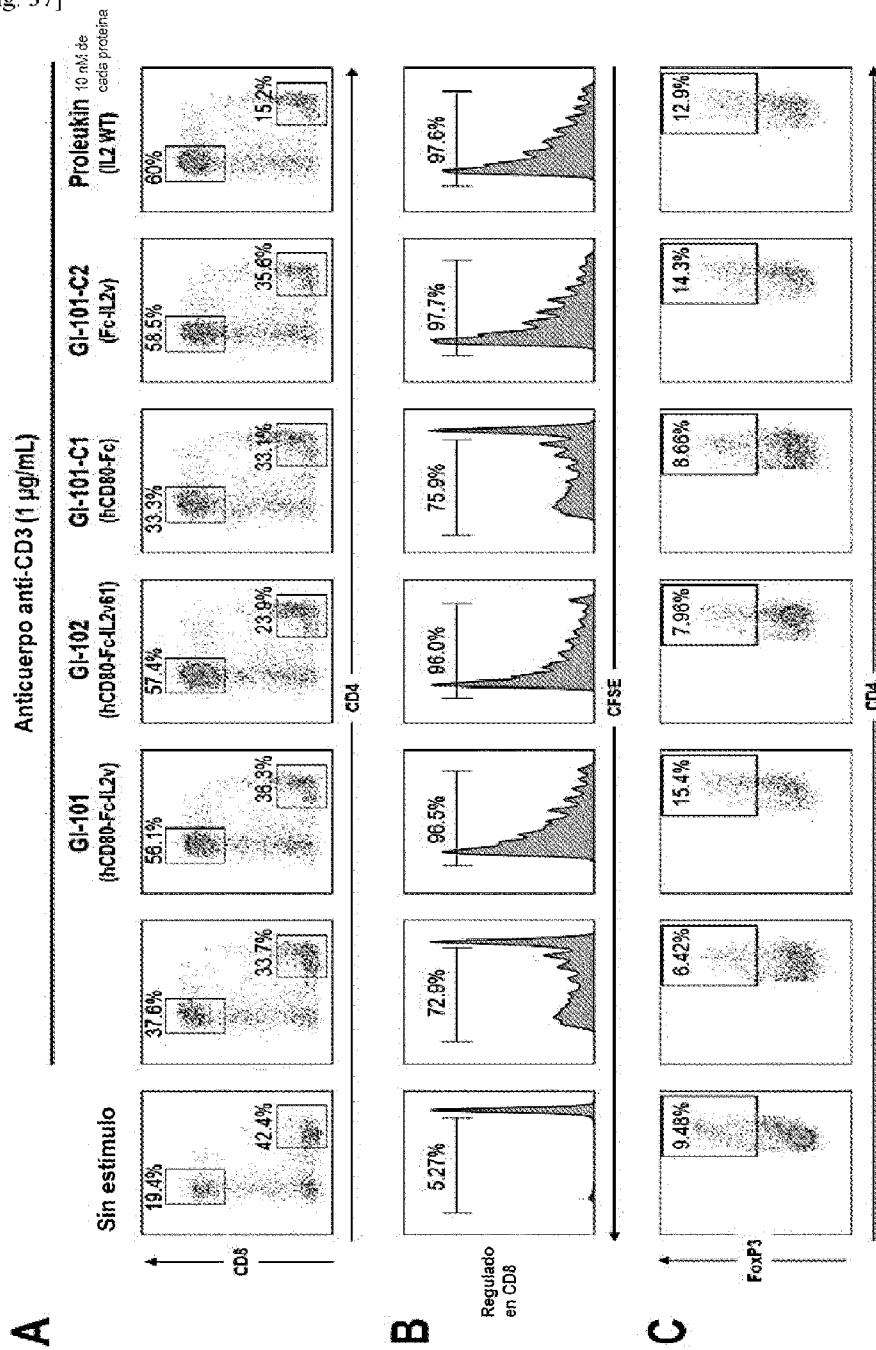
[Fig. 35]



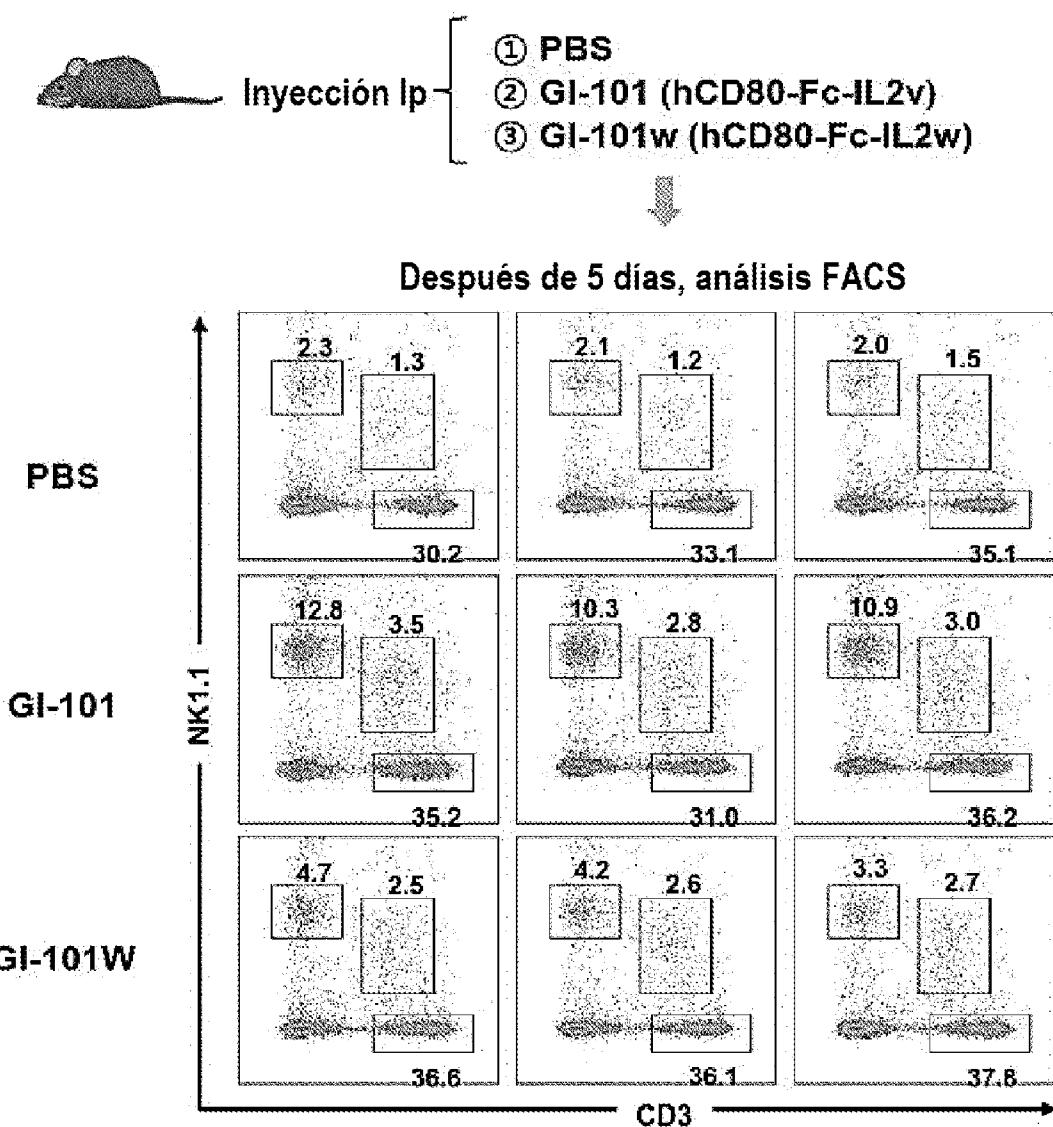
[Fig. 36]



[Fig. 37]

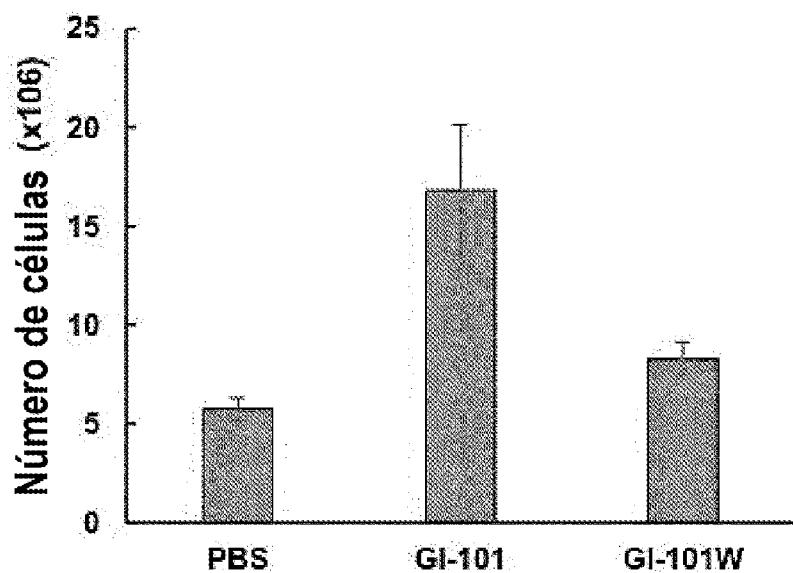


[Fig. 38]

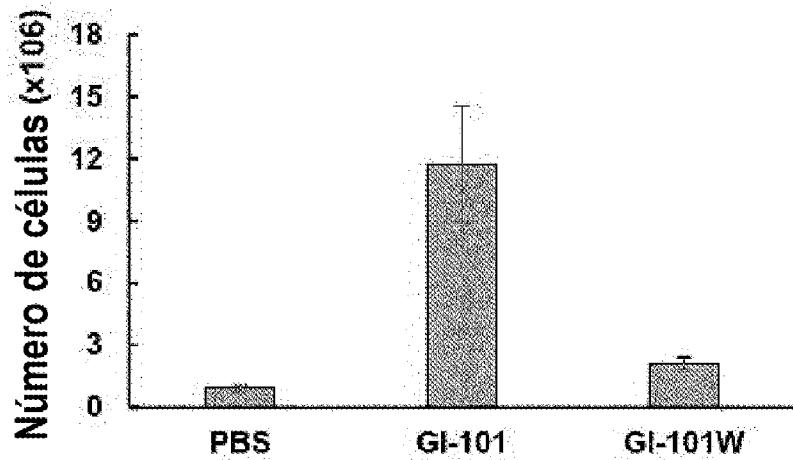


[Fig. 39]

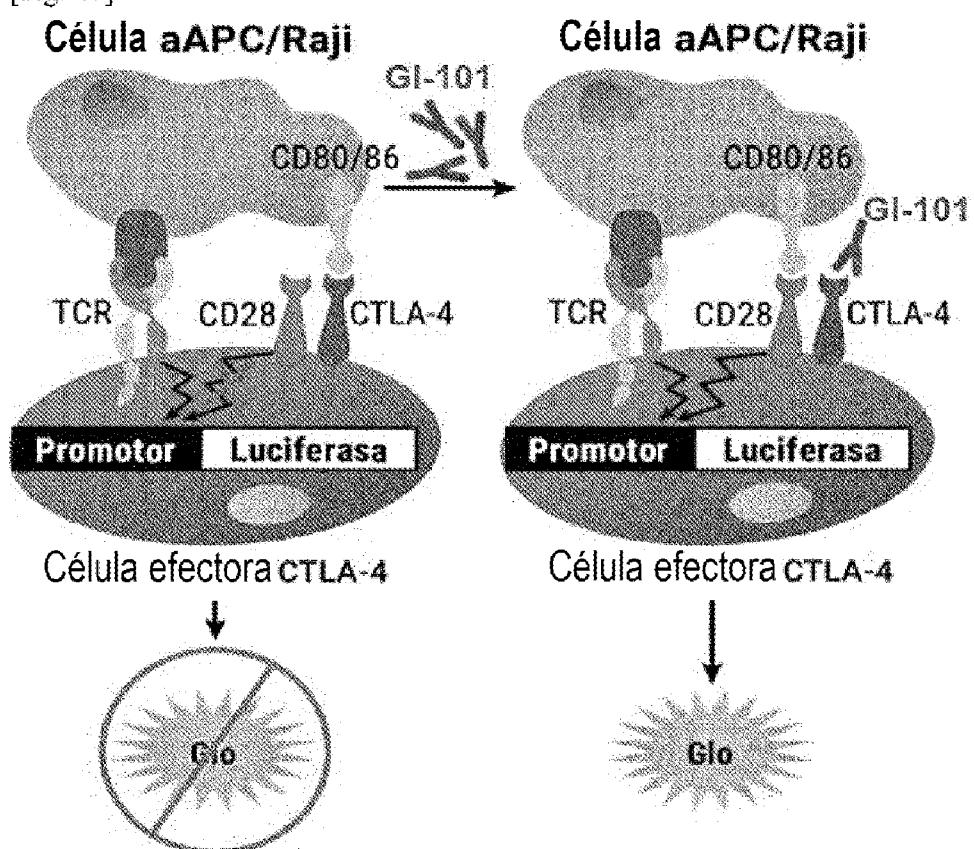
### Células T CD8



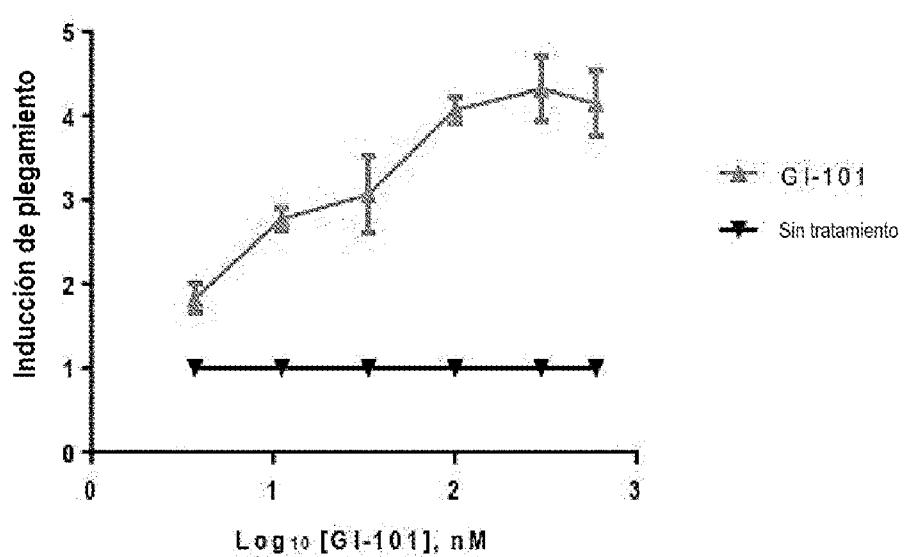
### Células NK



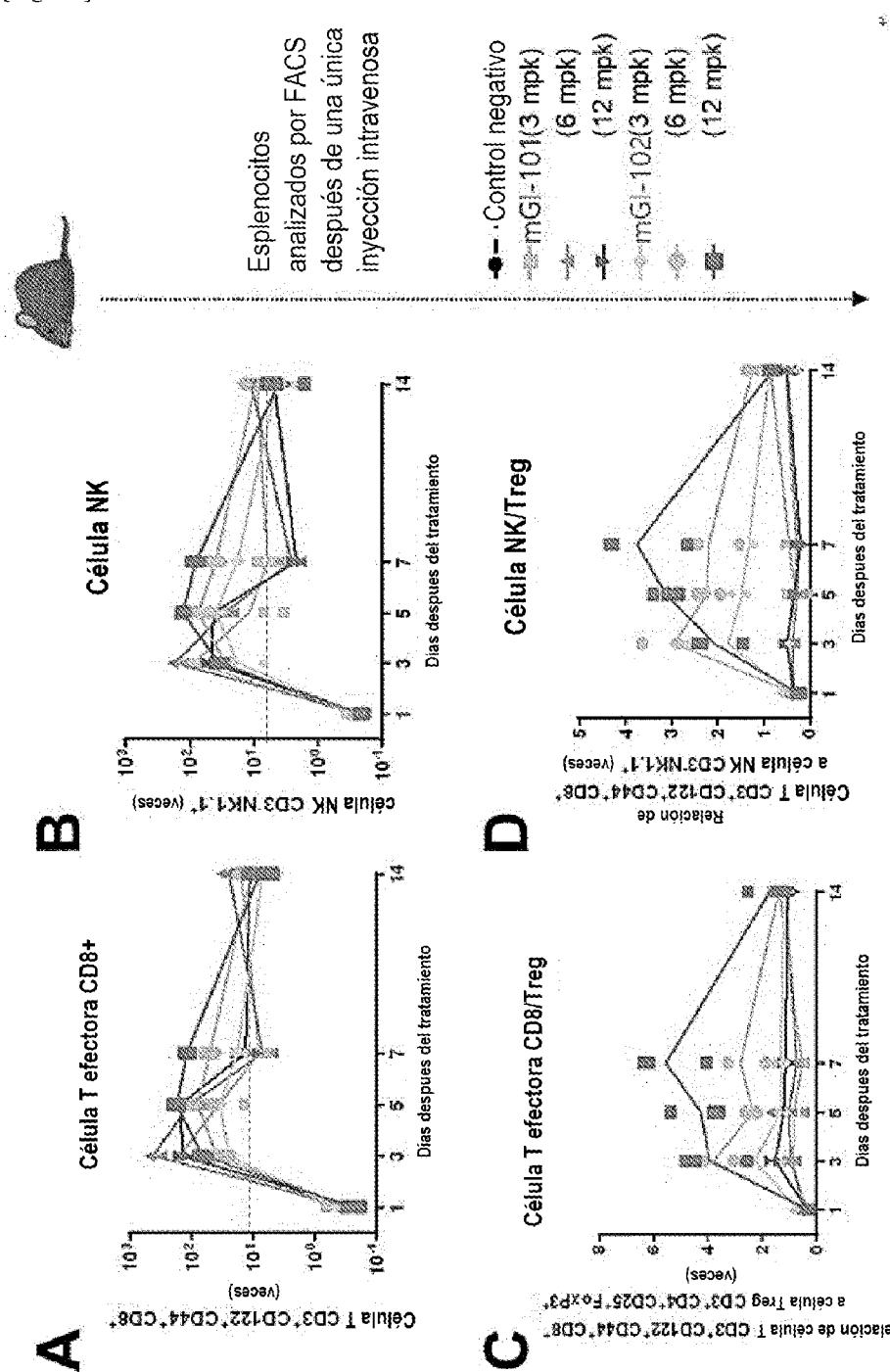
[Fig. 40]



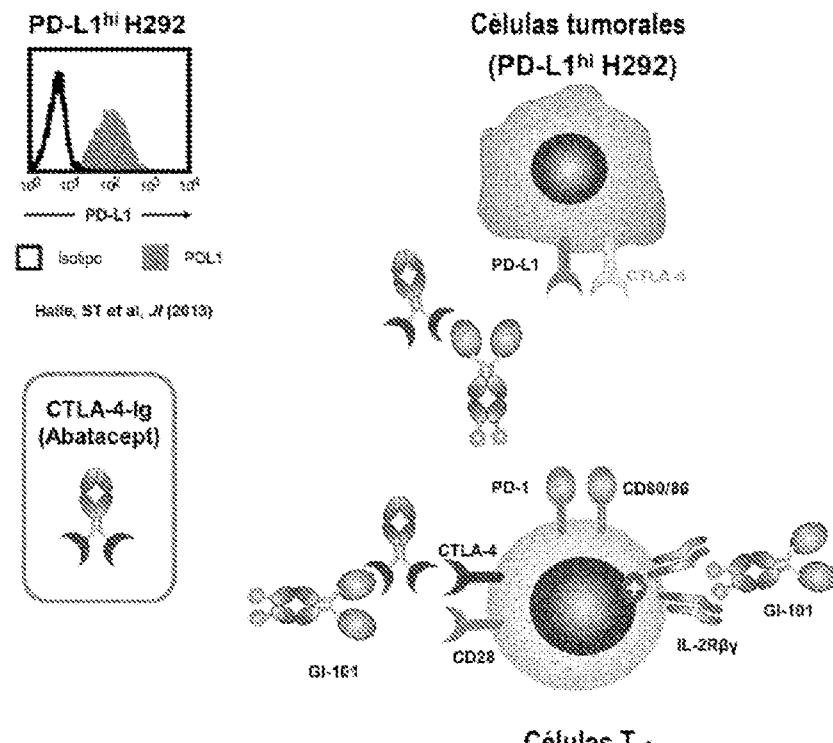
[Fig. 41]



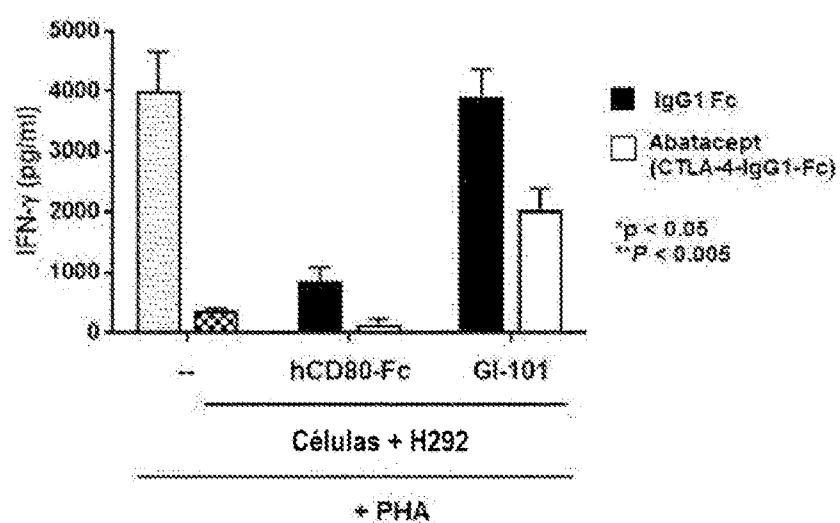
[Fig. 42]



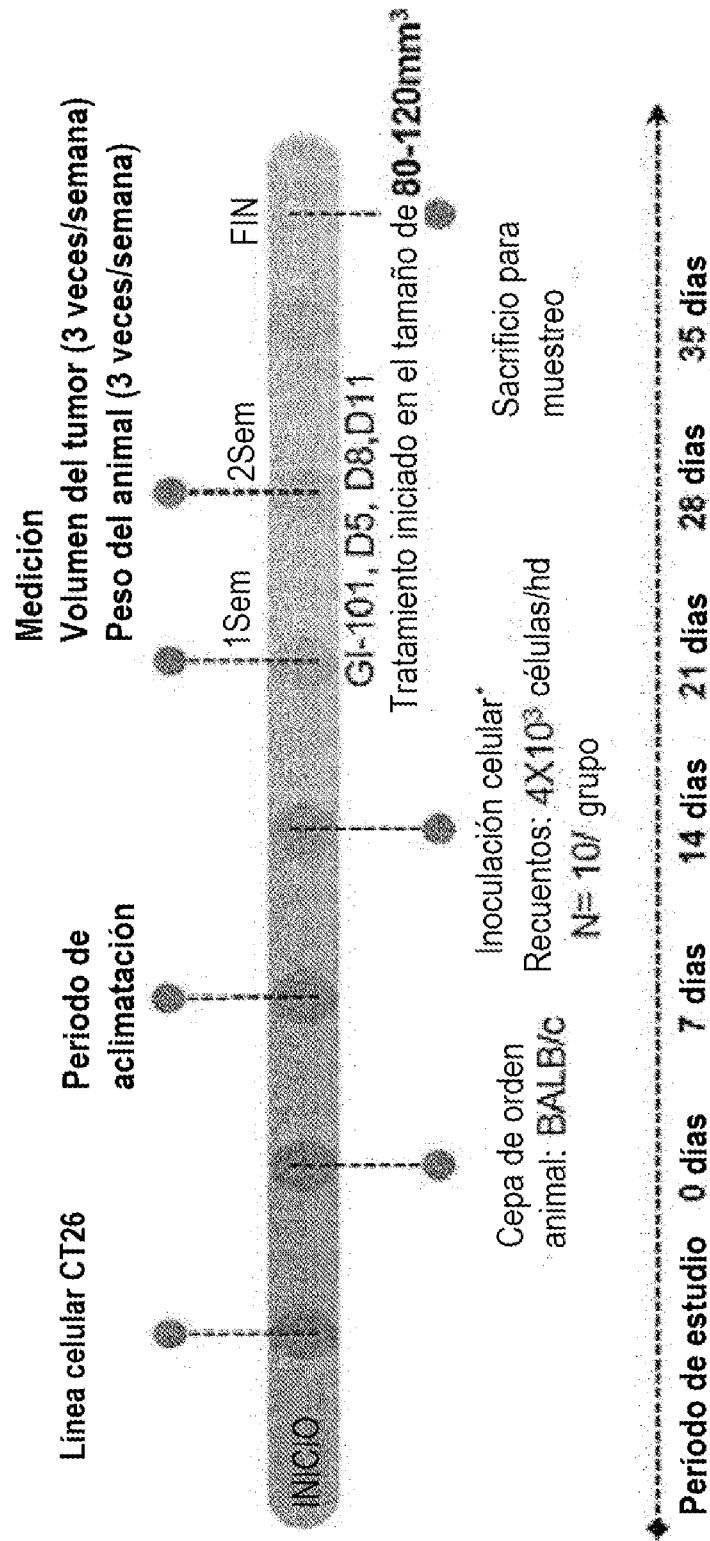
[Fig. 43]



[Fig. 44]

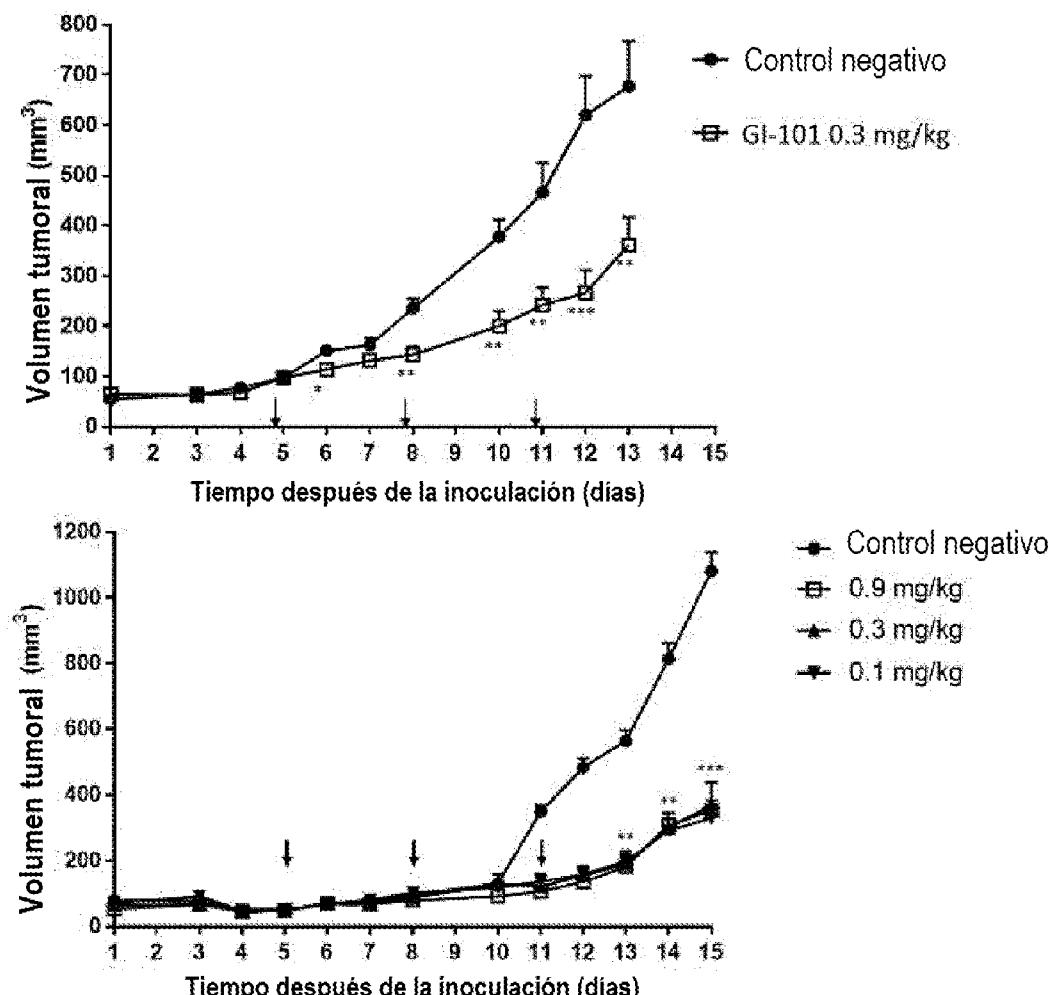


[Fig. 45]



# ES 2 985 387 T3

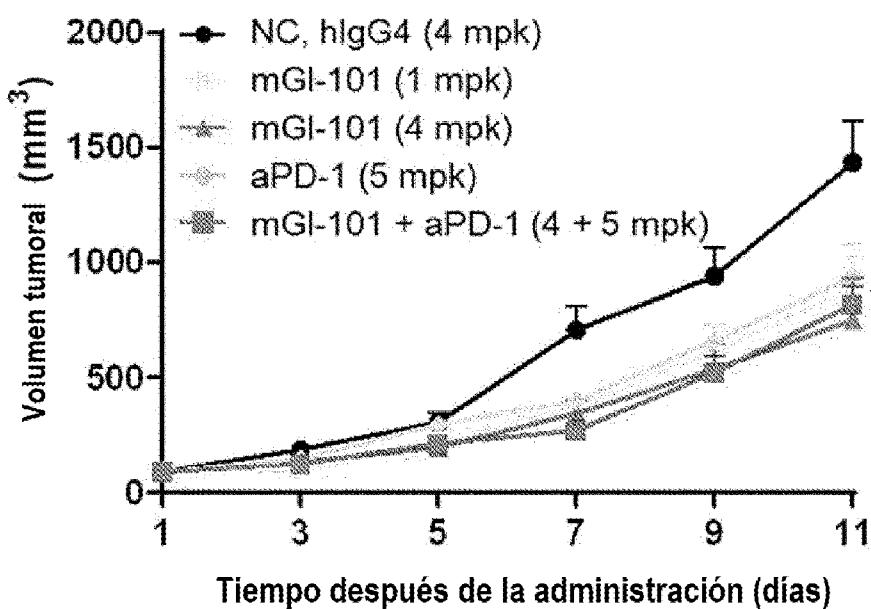
[Fig. 46]



\* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0.001

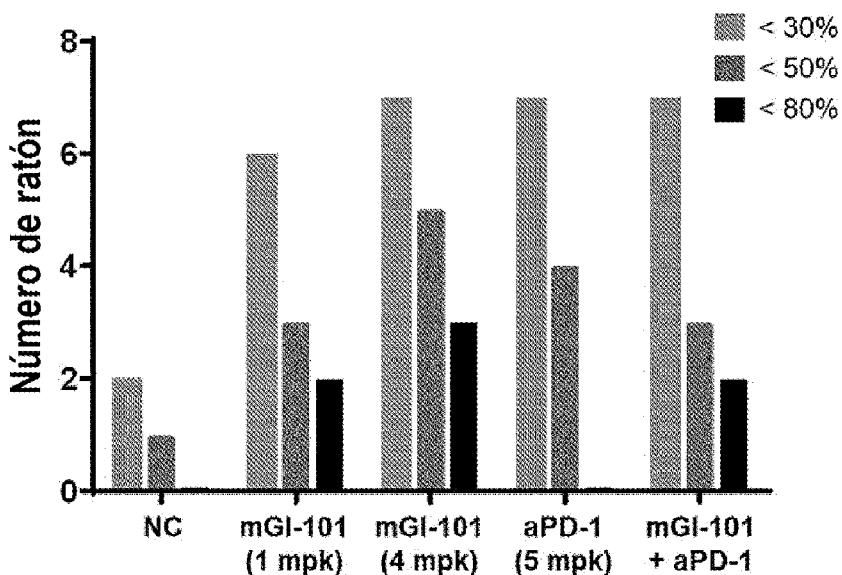
Cada punto representa la media + SE (n=10)

[Fig. 47]



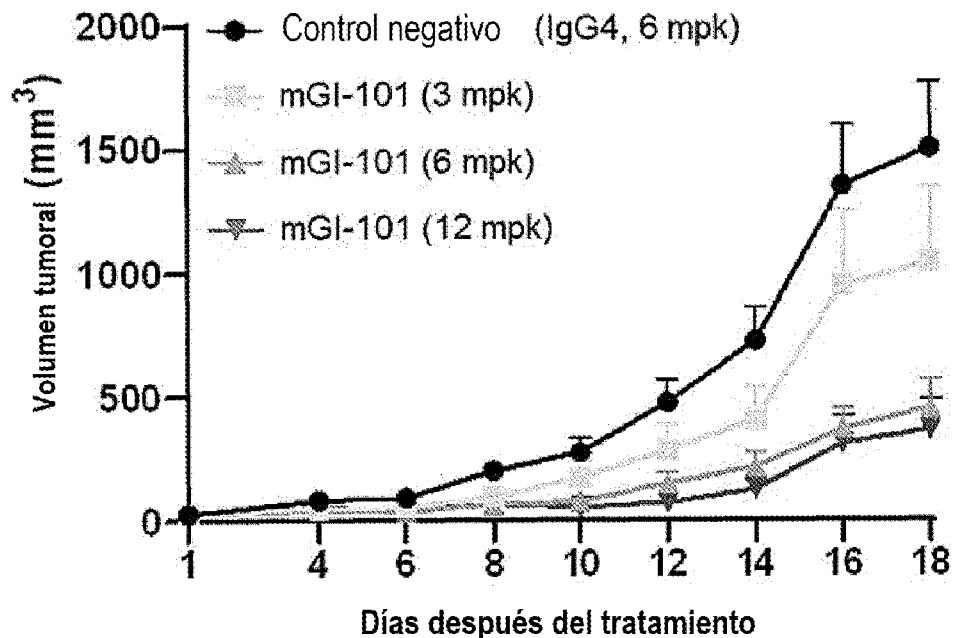
[Fig. 48]

### Inhibición del crecimiento tumoral

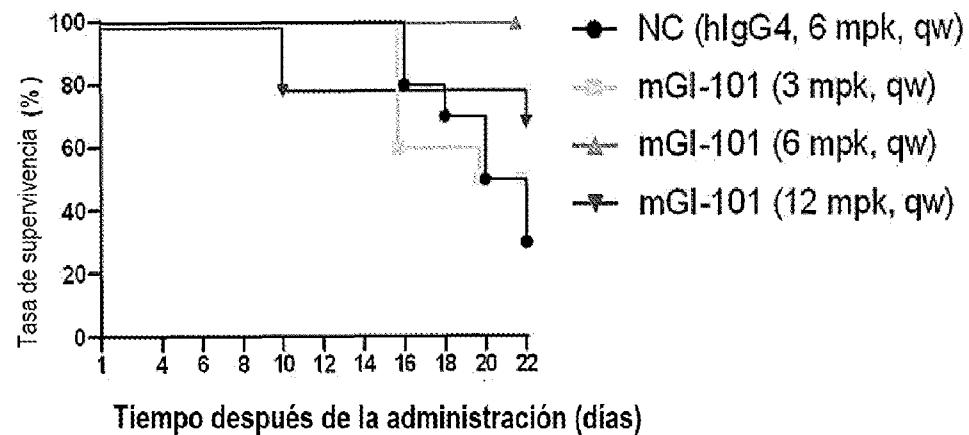


# ES 2 985 387 T3

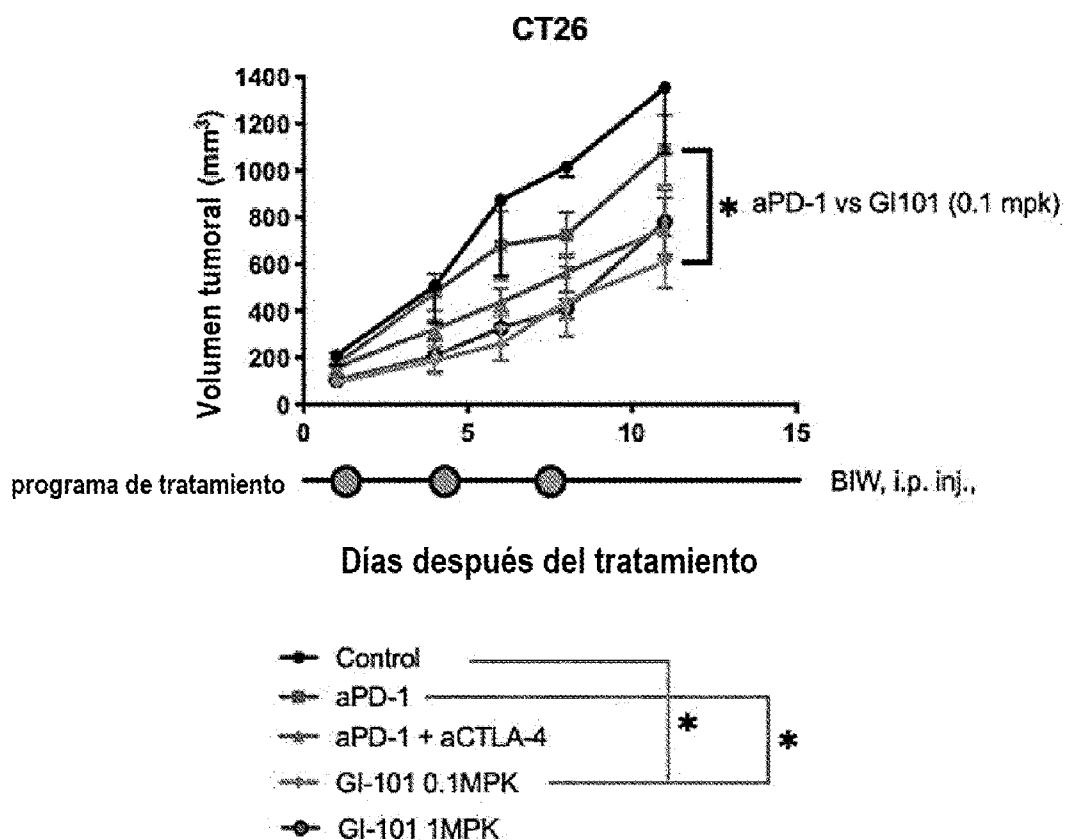
[Fig. 49]



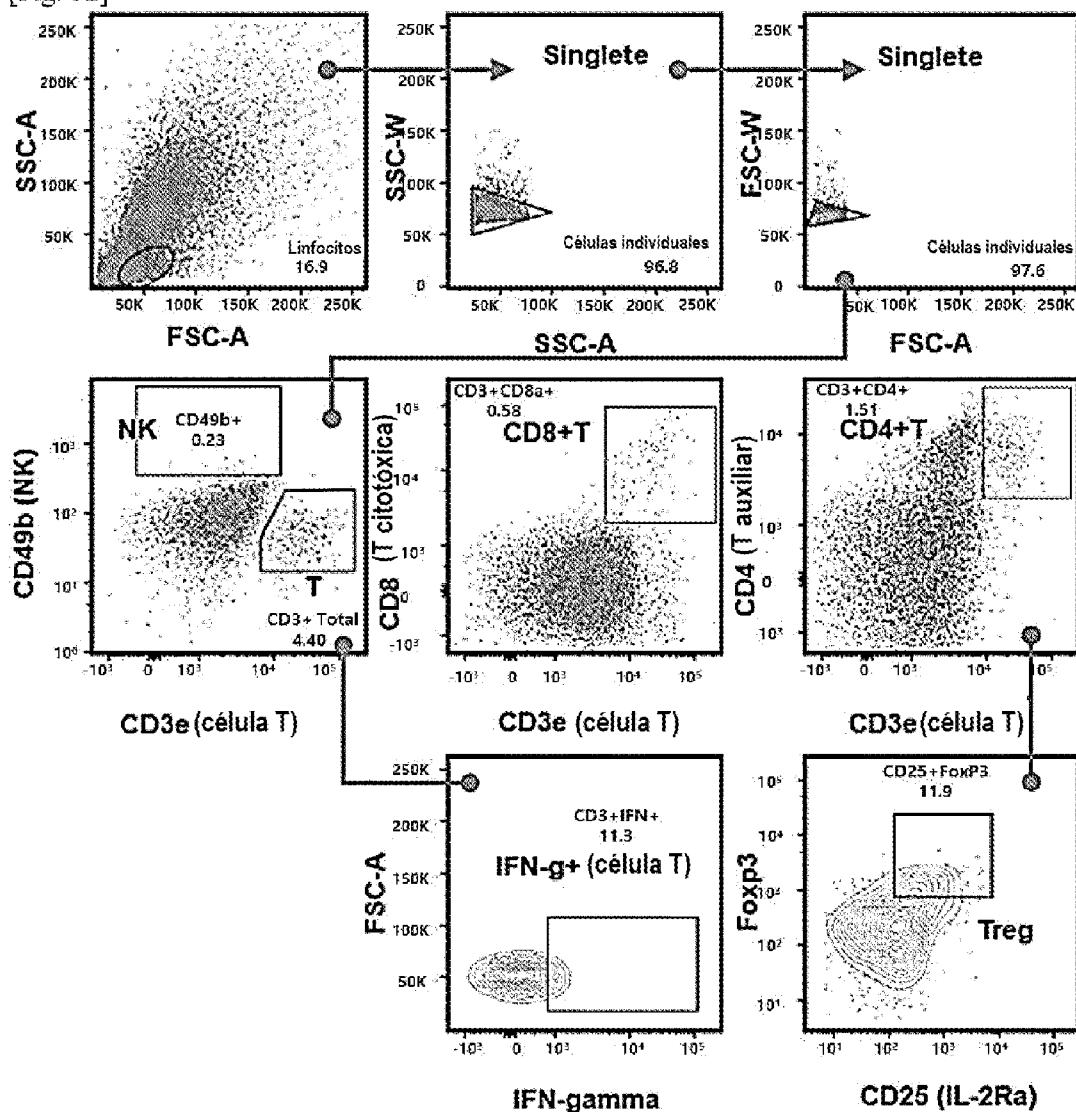
[Fig. 50]



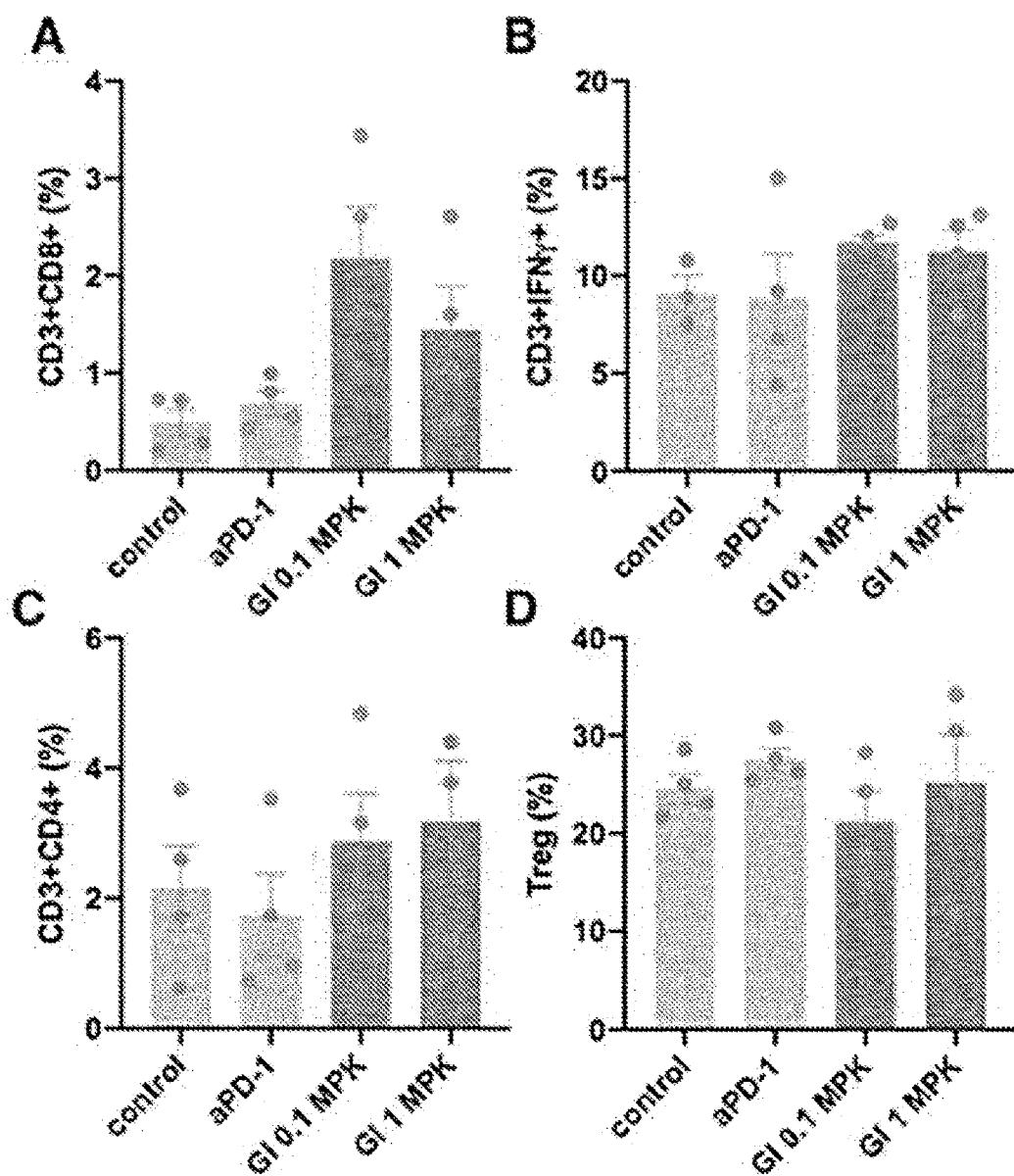
[Fig. 51]



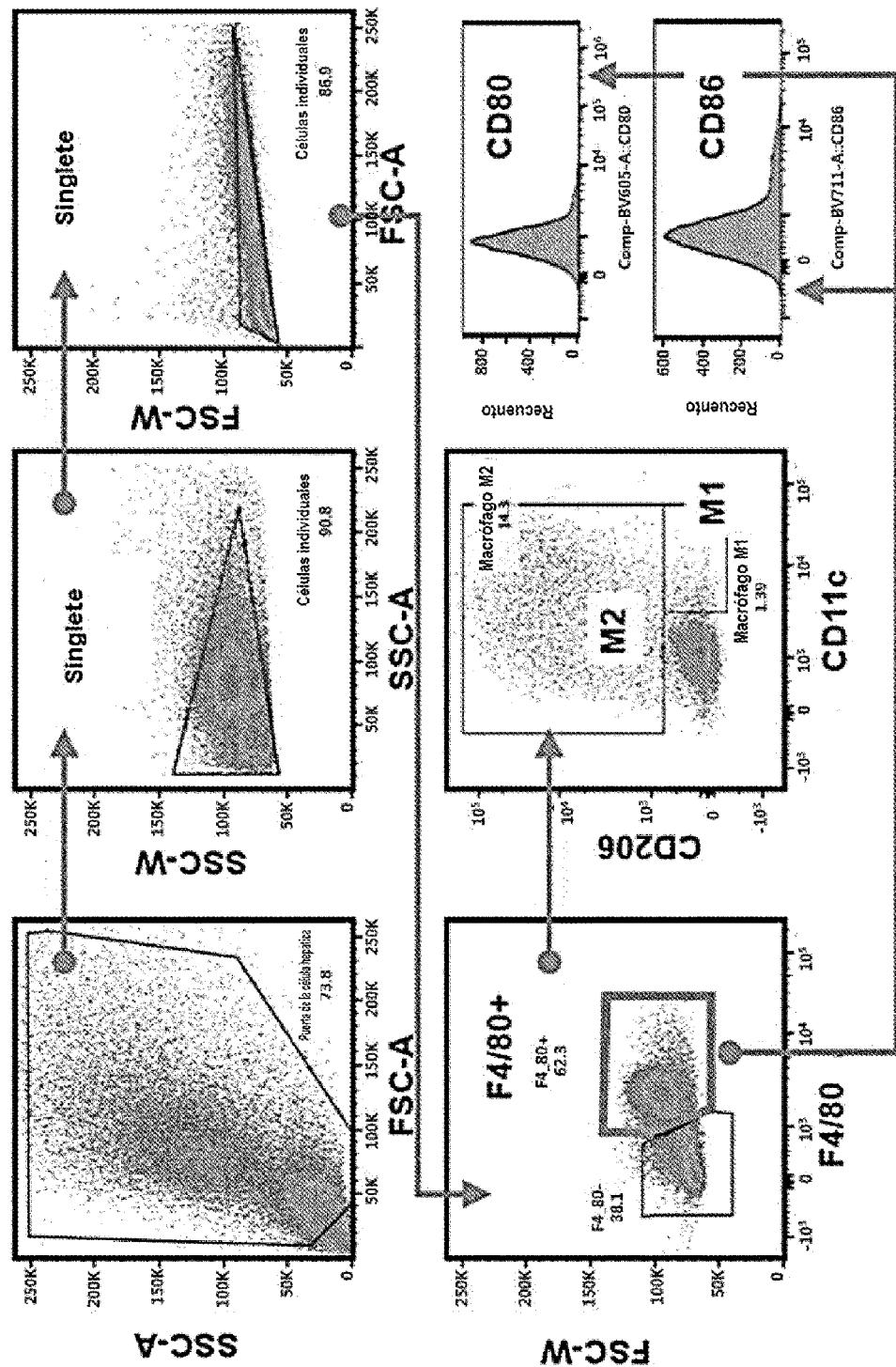
[Fig. 52]



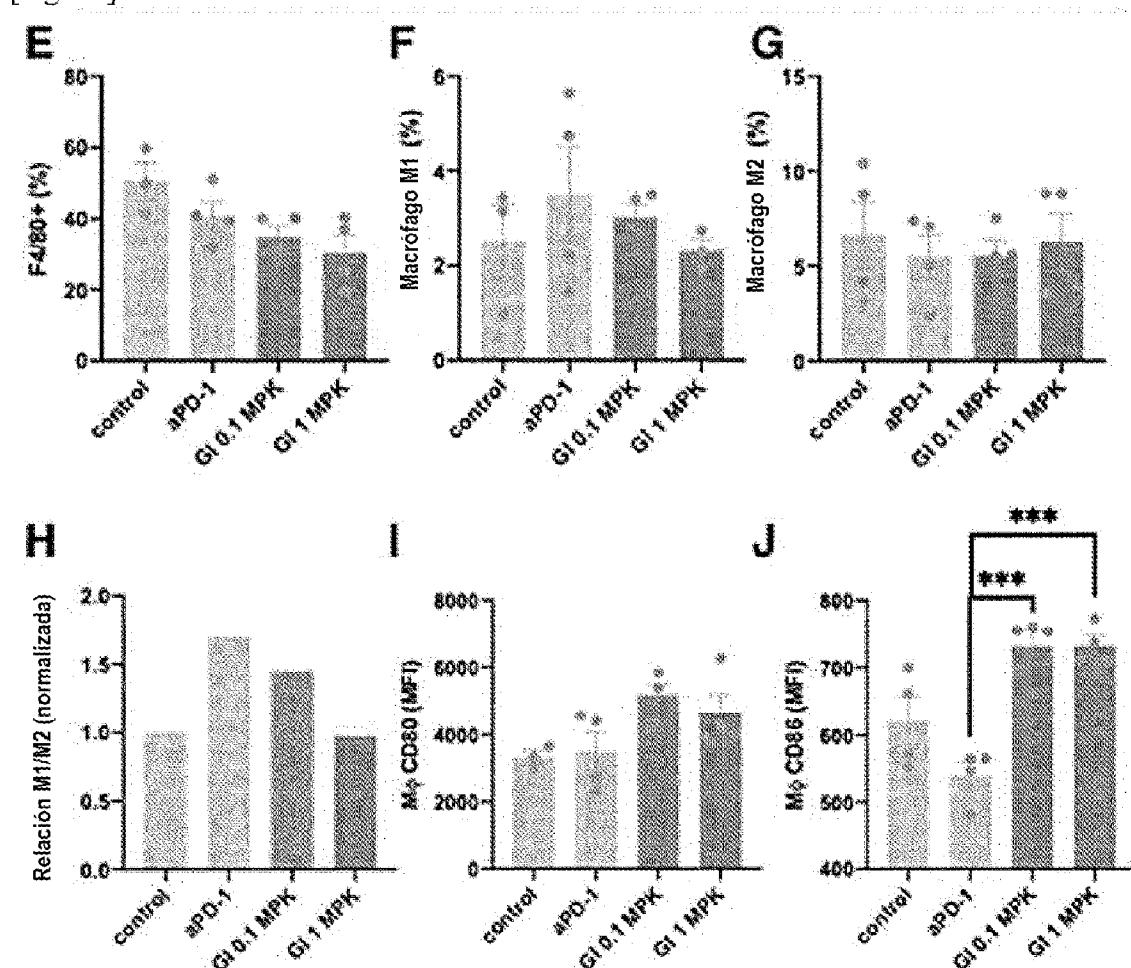
[Fig. 53]



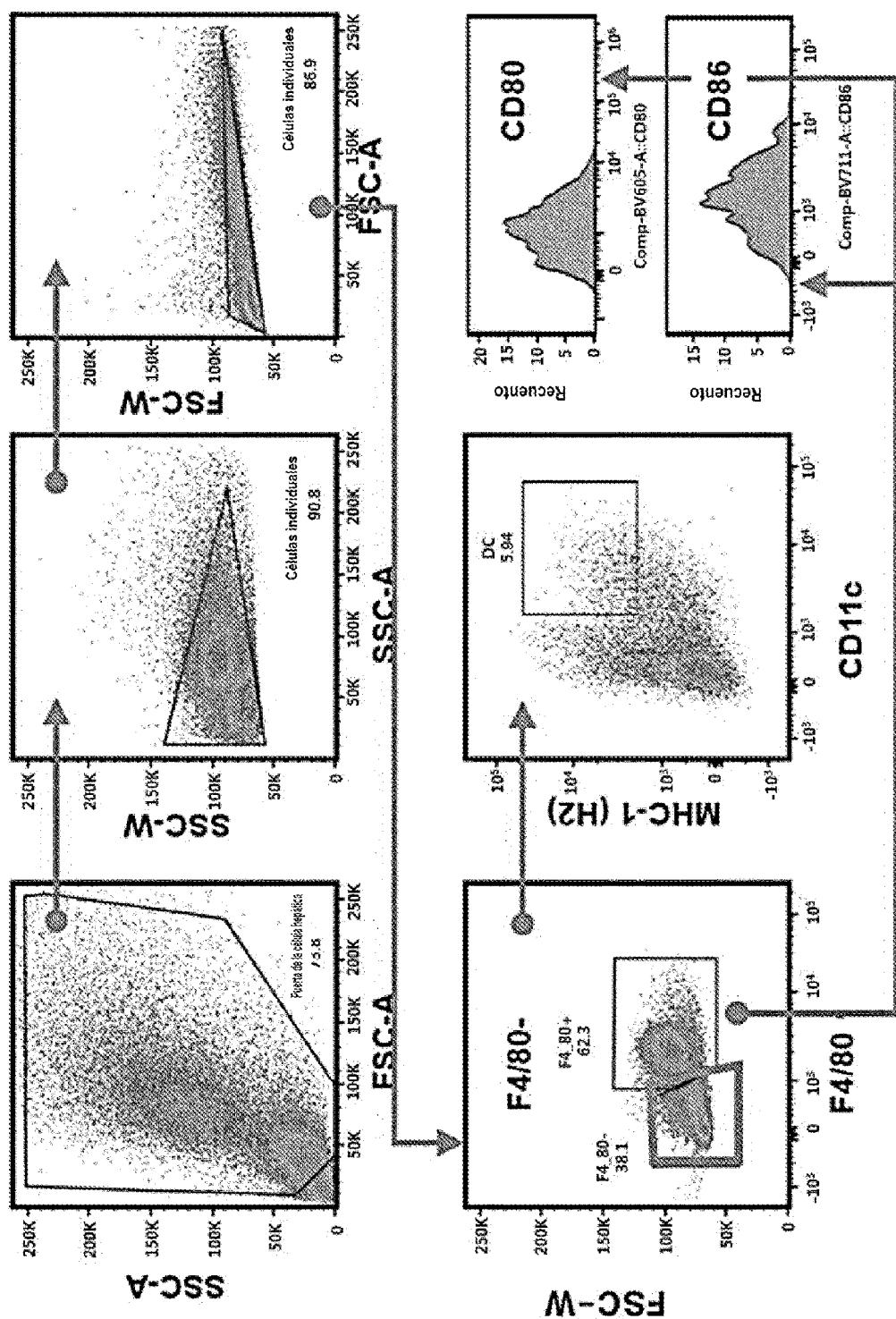
[Fig. 54]



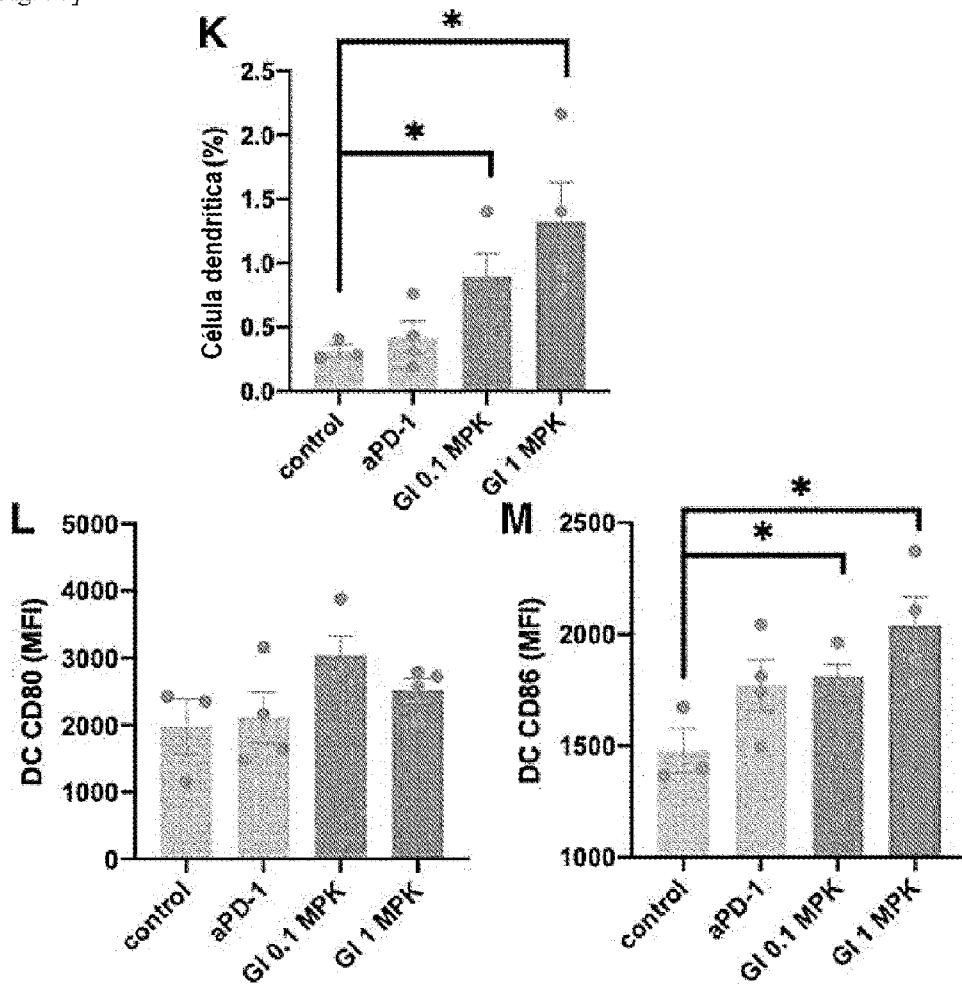
[Fig. 55]



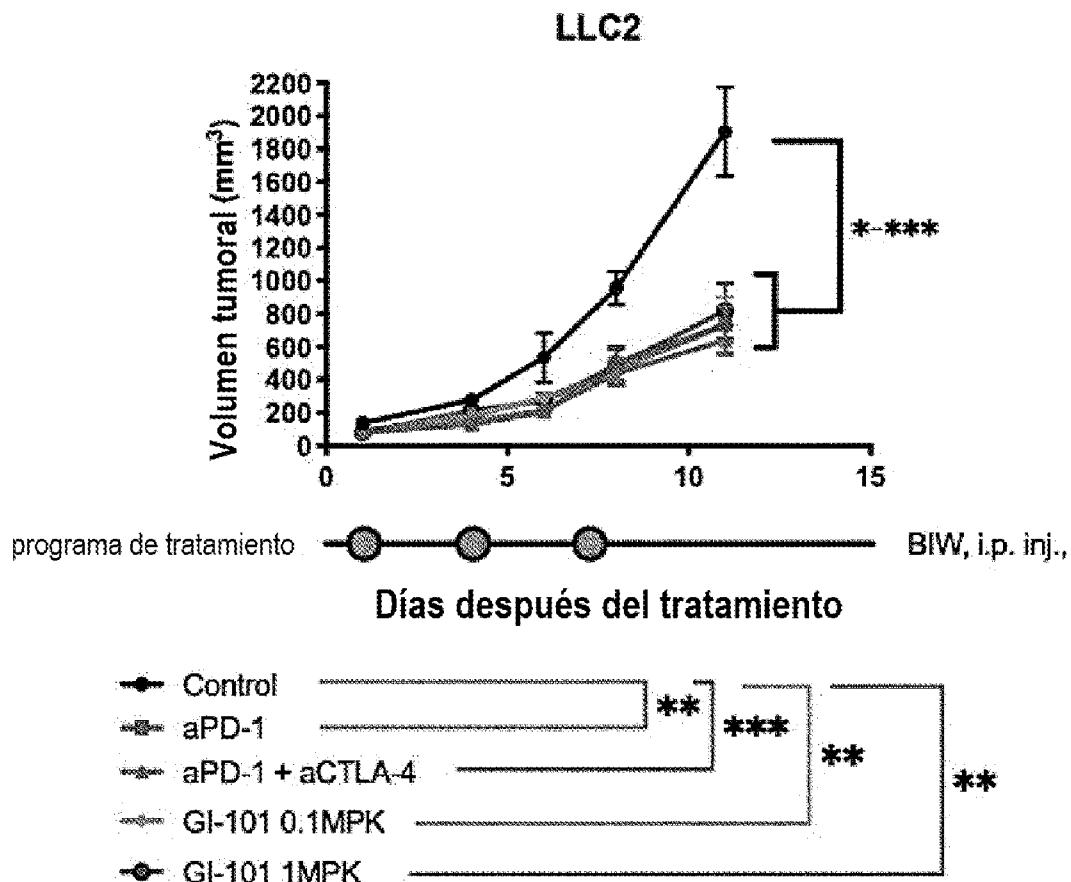
[Fig. 56]



[Fig. 57]

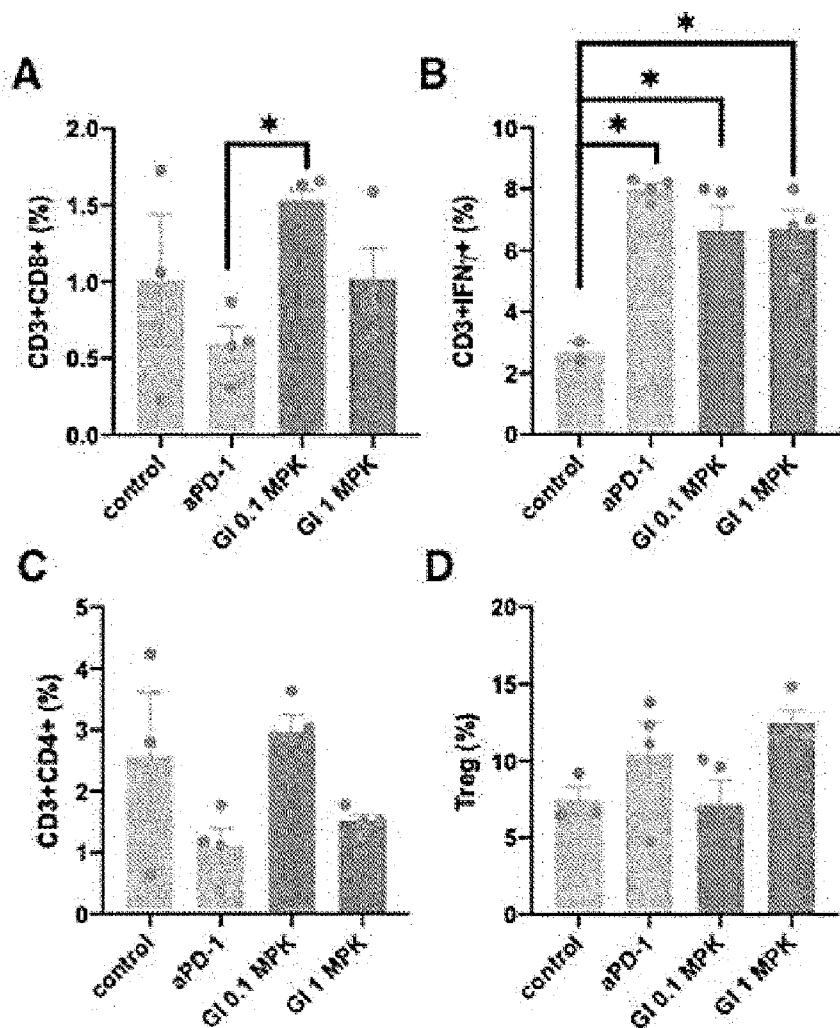


[Fig. 58]



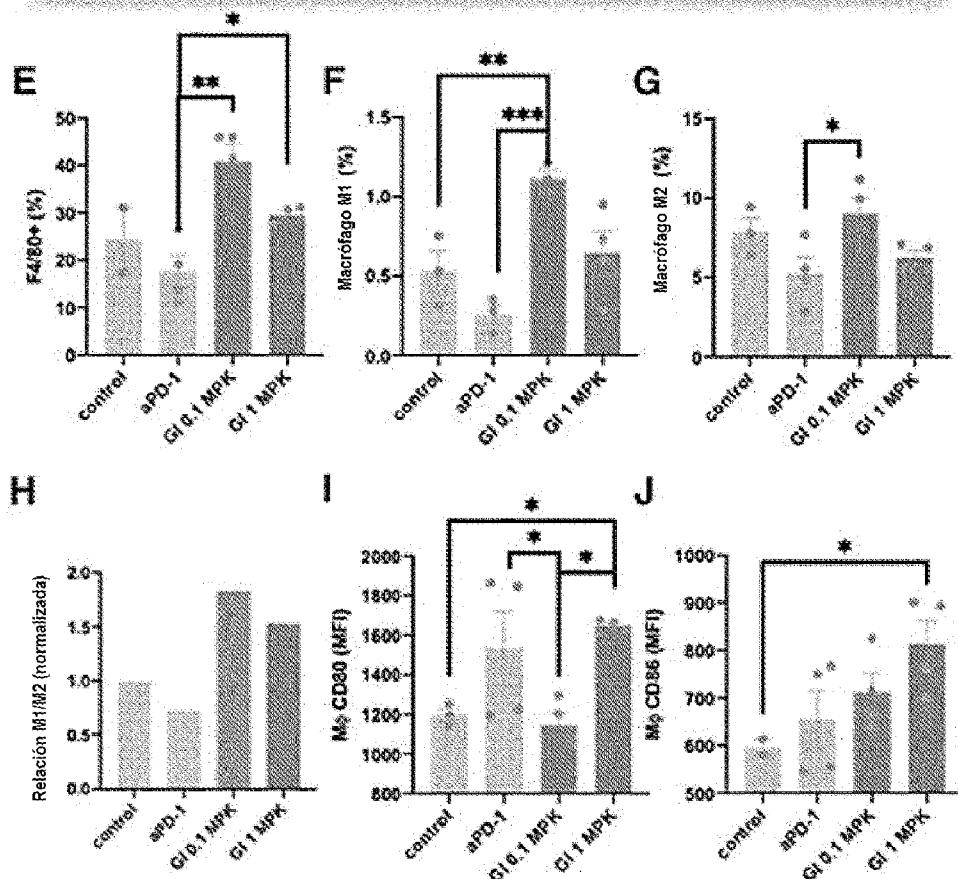
[Fig. 59]

Las células T que expresan IFN-gamma aumentaron después del tratamiento con GI-101, pero no aumentaron la población de células T reguladoras en el tumor



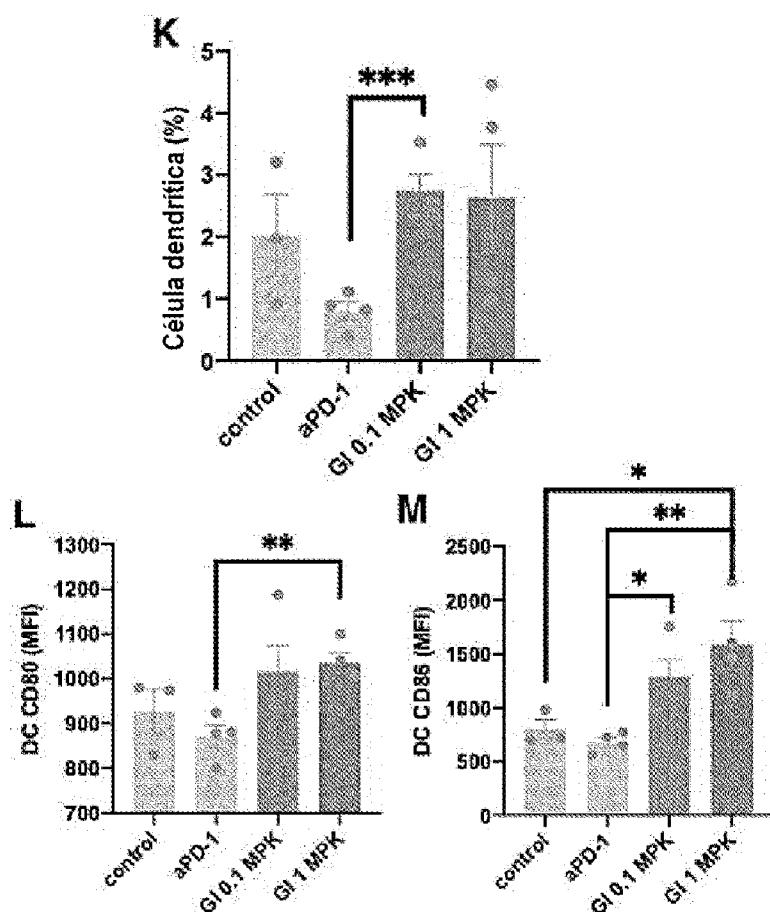
[Fig. 60]

**Los macrófagos M1 aumentaron después del tratamiento con GI-101 (LLC2)**



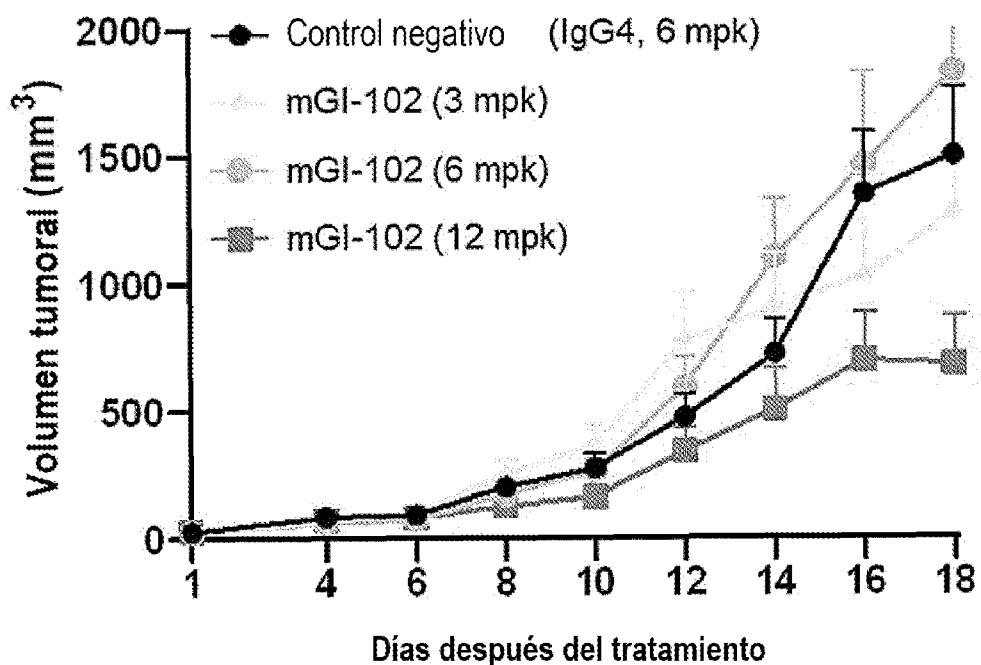
[Fig. 61]

**La población de células dendríticas y los efectos de presentación de antígenos aumentaron después del tratamiento con GI-101 (LLC2)**

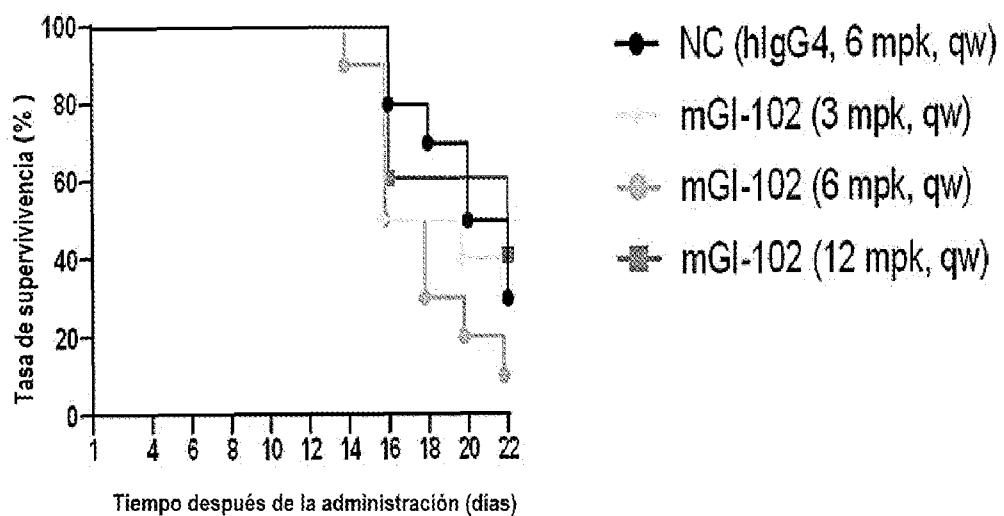


### ES 2 985 387 T3

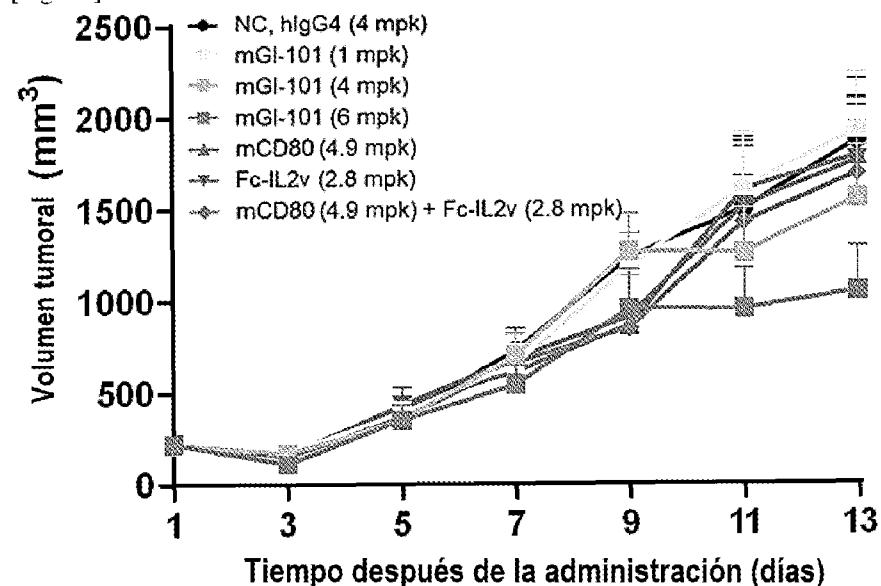
[Fig. 62]



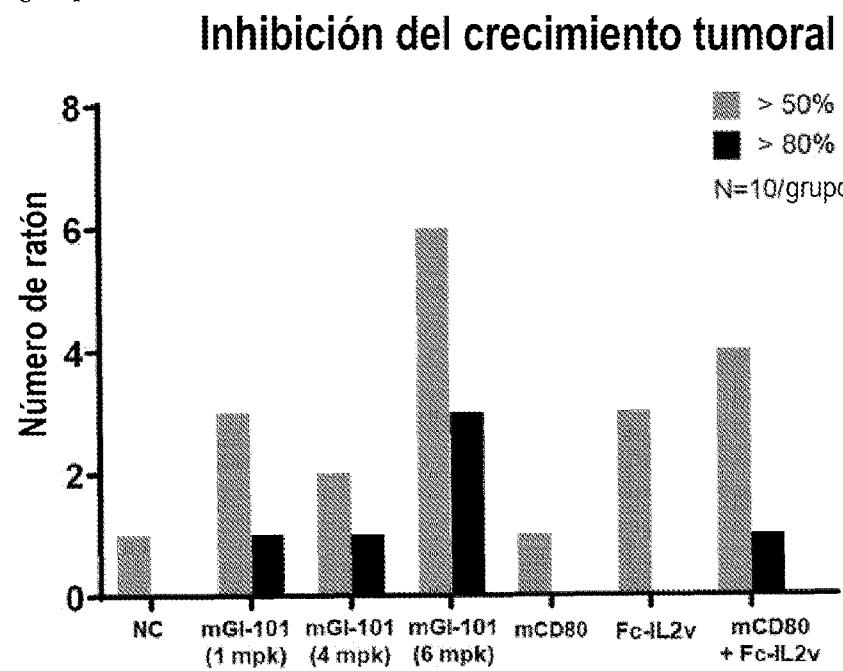
[Fig. 63]



[Fig. 64]



[Fig. 65]



[Fig. 66]

Toxicidad por dosis intravenosa durante 2 semanas de G1-101 en mono Cynomolgus

Tabla 1 Observaciones clínicas

Sexo: Macho

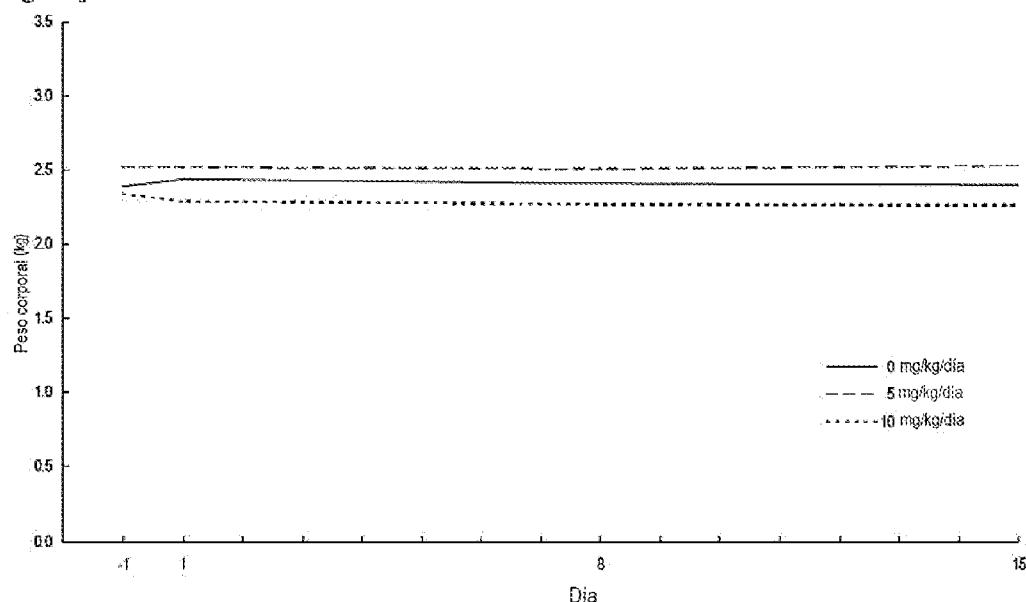
Grupo	Animal	Día												Día de la necropsia	
		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0 mg/kg/día	CJMK01	NA	NA	Pre	0.5 h	am	am	am	am	Pre	0.5 h	am	am	am	am
0 mg/kg/día	CJMK02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0 mg/kg/día	CJMK03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5 mg/kg/día	CJMK01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5 mg/kg/día	CJMK02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5 mg/kg/día	CJMK03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10 mg/kg/día	CJMK01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10 mg/kg/día	CJMK02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10 mg/kg/día	CJMK03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Nota: Generada a pie de página. Pre: Pre-dosisificación 0.5 h; 0.5 horas post-dosisificación

NA: Sin anomalías clínicas o fecales

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 67]



[Fig. 68]

Peso corporal (kg)

Sexo: Macho		0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Dia(s) relativos a la fecha de inicio				
*1	Media S.D. N	2.39 0.10 3	2.52 0.31 3	2.34 0.16 3
1	Media S.D. N	2.44 0.07 3	2.52 0.31 3	2.29 0.16 3
5	Media S.D. N	2.41 0.12 3	2.51 0.34 3	2.27 0.08 3
15	Media S.D. N	2.40 0.12 3	2.53 0.34 3	2.26 0.11 3

Prueba estadística: Prueba generalizada de Anova/Ancova Transformación: Identidad (Sin Transformación)

[Fig. 69]

Toxicidad por dosis intravenosa durante 2 semanas de GI-101 en mono Cynomolgus

Tabla 3 Consumo de comida

Sexo Macho	Animal	Día	Unidad: (g/día)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo	Nº.													
0	GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
mg/kg/día	GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Media		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S.D.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
mg/kg/día	GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Media		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S.D.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
10	GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
mg/kg/día	GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
GI-101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Media		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S.D.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 70]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
%Retic. (%)	-2	Media S.D. N	0.75 0.07 3	1.40 0.52 3	0.93 0.30 3
	15	Media S.D. N	1.67 0.61 3	3.10 d <sup>r</sup> 0.55 3	3.14 d <sup>r</sup> 0.32 3
#Retic. (10 <sup>9</sup> /L)	-2	Media S.D. N	44.0 7.0 3	81.9 28.4 3	55.1 19.7 3
	15	Media S.D. N	91.5 33.6 3	171.6 d <sup>r</sup> 32.3 3	161.5 d <sup>r</sup> 17.2 3
PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	-2	Media S.D. N	404 25 3	380 90 3	380 28 3
	15	Media S.D. N	501 29 3	522 135 3	601 85 3

[Fig. 71]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	-2	Media S.D. N	10.59 1.63 3	8.18 1.43 3	8.29 2.11 3
	15	Media S.D. N	8.09 0.25 3	12.08 0.74 3	16.52 6.81 3
%Neut (%)	-2	Media S.D. N	38.1 23.2 3	23.1 3.2 3	23.6 13.1 3
	15	Media S.D. N	35.9 14.3 3	14.5 2.1 3	22.4 14.2 3
%Linf (%)	-2	Media S.D. N	57.7 21.7 3	71.6 2.8 3	69.8 13.7 3
	15	Media S.D. N	59.6 13.1 3	81.2 1.4 3	69.5 15.0 3

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 72]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
#Neut (10 <sup>3</sup> /μL)	-2	Media S.D. N	4.24 3.09 3	1.86 0.22 3	1.77 0.52 3
	15	Media S.D. N	2.93 1.26 3	1.76 0.35 3	3.11 0.63 3
#Linf (10 <sup>3</sup> /μL)	-2	Media S.D. N	5.92 1.78 3	5.87 1.24 3	5.98 2.54 3
	15	Media S.D. N	4.80 0.94 3	9.80 0.48 3	12.05 6.47 3
#Mono (10 <sup>3</sup> /μL)	-2	Media S.D. N	0.36 0.10 3	0.37 0.09 3	0.45 0.08 3
	15	Media S.D. N	0.32 0.11 3	0.33 0.06 3	0.77 d <sup>r</sup> 0.26 3

[Fig. 73]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
AST (U/L)	-2	Media S.D. N	38 19 3	45 21 3	30 7 3
	15	Media S.D. N	24 5 3	34 5 3	33 8 3
ALT (U/L)	-2	Media S.D. N	58 51 3	72 71 3	34 8 3
	15	Media S.D. N	34 6 3	52 44 3	36 5 3
ALP (U/L)	-2	Media S.D. N	1511 542 3	1688 258 3	1972 357 3
	15	Media S.D. N	1395 365 3	1444 346 3	1565 235 3

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 74]

Sexo: Macho			0 nigropis	5 nigropis	10 nigropis
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
LQ (BL)	-2	Media S.D. N	235 8 3	233 87 3	292 47 3
	15	Media S.D. N	238 15 3	304 27 3	381 ad <sup>a</sup> 58 3
OK (BL)	-2	Media S.D. N	132 23 3	140 4 3	182 61 3
	15	Media S.D. N	129 31 3	128 19 3	180 23 3
GU (mgsL)	-2	Media S.D. N	98 57 3	91 4 3	112 25 3
	15	Media S.D. N	87 8 3	88 17 3	104 5 3

[Fig. 75]

Sexo: Macho			0 nigropis	5 nigropis	10 nigropis
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
BL (mg/dL)	-2	Media S.D. N	0.10 0.02 3	0.15 e 0.03 3	0.16 0.01 3
	15	Media S.D. N	0.11 0.04 3	0.15 0.03 3	0.16 0.03 3
UN (mg/dL)	-2	Media S.D. N	19.1 7.2 3	15.4 2.3 3	18.6 4.5 3
	15	Media S.D. N	16.2 5.6 3	13.9 8.7 3	14.2 2.4 3
CRE (mg/dL)	-2	Media S.D. N	0.73 0.07 3	0.68 0.17 3	0.73 0.16 3
	15	Media S.D. N	0.72 0.06 3	0.66 0.13 3	0.65 0.11 3

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 76]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
CHO (mg/dL)	-2	Media S.D. N	109 23 3	162 59 3	147 47 3
	15	Media S.D. N	108 24 3	159 46 3	143 34 3
TG (mg/dL)	-2	Media S.D. N	44 24 3	27 12 3	40 2 3
	15	Media S.D. N	35 2 3	29 14 3	34 14 3
PL (mg/dL)	-2	Media S.D. N	180 48 3	236 43 3	220 65 3
	15	Media S.D. N	164 31 3	216 52 3	195 40 3

[Fig. 77]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Día(s) relativos a la fecha de inicio					
IP (mg/dL)	-2	Media S.D. N	5.16 1.16 3	5.14 0.91 3	5.00 0.90 3
	15	Media S.D. N	5.52 0.61 3	5.84 0.61 3	5.66 0.84 3
CA (mg/dL)	-2	Media S.D. N	9.63 0.59 3	9.82 0.65 3	9.79 0.19 3
	15	Media S.D. N	9.45 0.57 3	9.48 0.25 3	9.31 0.03 3
NA (mEq/L)	-2	Media S.D. N	152.8 2.4 3	154.5 4.2 3	153.9 2.5 3
	15	Media S.D. N	151.8 3.3 3	153.5 2.0 3	153.4 3.3 3

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 78]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Dia(s) relativos a la fecha de inicio					
K (mEq/L)	-2	Media S.D. N	4.28 0.69 3	4.17 0.29 3	3.90 0.40 3
	15	Media S.D. N	3.99 0.50 3	4.09 0.18 3	3.85 0.14 3
CL (mEq/L)	-2	Media S.D. N	112.3 22 3	111.1 39 3	110.7 26 3
	15	Media S.D. N	111.5 0.7 3	109.6 37 3	110.2 28 3
TP (g/dL)	-2	Media S.D. N	7.20 0.59 3	7.36 0.42 3	7.53 0.22 3
	15	Media S.D. N	6.99 0.62 3	7.22 0.37 3	7.30 0.11 3

[Fig. 79]

Sexo: Macho			0 mg/kg/día	5 mg/kg/día	10 mg/kg/día
Dia(s) relativos a la fecha de inicio					
ALB (g/dL)	-2	Media S.D. N	4.18 0.34 3	4.11 0.46 3	4.14 0.19 3
	15	Media S.D. N	4.09 0.36 3	3.98 0.47 3	3.88 0.17 3
A/G	-2	Media S.D. N	1.39 0.06 3	1.27 0.19 3	1.22 0.04 3
	15	Media S.D. N	1.41 0.04 3	1.24 0.22 3	1.13 0.07 3

## Sexo: Macho

[Fig. 80]

Grupo	Animal	Factor-a de necrosis tumoral						Interferón-y						Interleucina-1β						Interleucina-2						Interleucina-4					
		Proteína			(pg/ml)			Proteína			(pg/ml)			Proteína			(pg/ml)			Proteína			(pg/ml)			Proteína			(pg/ml)		
		Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15	Día 3	Día 8	Día 15			
0 mg/kg/día	CJ1M01	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
	CJ1M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
	CJ1M03	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
5 mg/kg/día	Media	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
	S.D.	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10 mg/kg/día	Media	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
	S.D.	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10 mg/kg/día	Media	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
	S.D.	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Nota general a pie de página: Día 8: Antes de la cosificación

BLQ: Por debajo del límite inferior de cuantificación (4.9 para interleucina-4, 2.4 pg/ml para los otros)

Cuando las concentraciones en plasma eran BLQ en 1 de los 3 animales, se calculó la media de los 2 animales restantes  
La media se consideró como NC, cuando las concentraciones en plasma en 2 de los 3 animales eran BLQ.

N.C.: No calculada

Sexo: Macho

Fig. 81]

Grupo	Animal No.	Interleucina-6 (pg/ml)						Interleucina-8 (pg/ml)						Interleucina-10 (pg/ml)						Interleucina-12 (pg/ml)					
		Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3			Prueba 4			Prueba 5			Prueba 6			Prueba 7			Prueba 8		
		Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15	Dia 3	Dia 8	Dia 15
0 mg/kg/día	C1M01	BLQ	2.95	BLQ	3.34	4047.41	4861.65	7894.37	5783.89	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C1M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	3418.18	1382.07	6035.41	4056.95	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C1M03	BLQ	2.78	BLQ	BLQ	809.60	905.96	972.78	981.31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5 mg/kg/día	C2M01	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	4800.40	3355.74	5986.48	5511.93	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C2M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2533.51	2388.95	4778.15	5256.00	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C2M03	BLQ	2.91	BLQ	BLQ	7482.97	6571.61	9633.74	8892.13	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
10 mg/kg/día	C3M01	NC	NC	NC	NC	4972.33	4105.43	6809.46	5556.69	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	C3M02	NC	NC	NC	NC	2429.25	2189.79	2544.64	2026.29	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	C3M03	BLQ	5.26	BLQ	BLQ	8312.98	2753.66	7101.75	8973.45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
N	Media	NC	NC	NC	NC	4972.33	4105.43	6809.46	5556.69	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	S.D.	NC	NC	NC	NC	2429.25	2189.79	2544.64	2026.29	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	N	0	1	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
10 mg/kg/día	C3M01	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	7136.73	2722.78	9385.51	9298.79	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C3M02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	5832.12	4900.91	8873.95	9812.62	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	C3M03	BLQ	2.41	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
N	Media	NC	3.84	NC	NC	7093.94	3459.12	8653.74	9361.62	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	S.D.	NC	NC	NC	NC	1240.98	1248.73	1454.44	423.10	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	N	0	2	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Nota general a pie de página: Día 8. Antes de la dosificación.

BLQ: Por debajo del límite inferior de cuantificación (12.2 pg/ml para interleucina-10, 24 pg/ml para los otros).

Cuando las concentraciones en plasma eran BLQ en 1 de los 3 animales, se calculó la media de los 2 animales restantes.

La media se consideró como NC, cuando las concentraciones en plasma en 2 de los 3 animales eran BLQ.

N.C.: No calculada

1 [d] - Prueba: Dunnett 2 caras p &lt; 0.05]

Sexo: Macho

[Fig. 82]

Grupo	Animal No.	Relación en linfocitos (%)												Célula NK	
		Célula T				Célula T CD4				Célula T CD8					
		Pre	D3	D6	D15	Pre	D3	D6	D15	Pre	D3	D6	D15		
0 mg/kg/día	CJMM01	43.2	57.1	57.0	53.3	28.0	34.9	34.6	32.9	15.1	15.3	16.0	13.5	1.5	
	CJMM02	69.4	68.5	67.3	55.2	27.3	28.6	25.4	19.0	35.7	31.7	35.6	30.4	0.8	
	CJMM03	55.4	70.8	61.2	51.6	27.5	38.7	29.9	22.3	22.5	26.9	25.3	24.8	1.3	
5 mg/kg/día	Media	58.0	65.5	61.8	53.4	27.6	34.4	30.0	24.7	24.4	24.6	26.0	22.9	1.1	
	S.D.	10.3	7.3	5.2	1.8	0.4	4.6	4.6	7.3	10.4	8.4	9.8	8.6	0.3	
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
10 mg/kg/día	CJMM01	62.6	86.7	60.8	59.7	25.0	55.3	22.7	17.1	32.2	25.1	32.2	35.4	1.0	
	CJMM02	52.1	75.9	55.3	51.9	22.7	41.0	24.3	18.4	24.8	28.2	25.6	25.6	0.8	
	CJMM03	61.0	78.0	62.9	59.3	17.2	31.0	16.2	17.2	38.0	39.4	40.8	36.4	0.8	
	Media	58.8	80.2	59.7	57.0	21.6	42.4	21.1	17.9	31.7	30.9	32.9	32.5	0.9	
	S.D.	5.3	5.7	3.9	4.4	4.0	12.2	4.3	13.3	6.6	7.5	7.6	6.0	0.1	
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	CJMM01	69.3	80.8	73.6	69.8	15.2	32.7	18.3	18.0	43.8	34.8	45.4	44.1	0.8	
	CJMM02	65.2	86.4	65.4	66.0	18.4	28.4	13.7	16.6	32.0	48.8	42.1	37.3	0.6	
	CJMM03	70.2	89.7	76.8	74.0	19.2	46.7	23.8	28.2	44.9	33.8	46.9	37.5	1.0	
	Media	68.2	85.6	71.9	69.9	17.6	35.9	18.6	20.9	42.6	39.1	44.1	39.6	0.8	
	S.D.	2.7	4.5	5.9	4.0	2.1	9.6	5.1	6.3	31	8.4	1.8	3.9	0.2	
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

Nota general a pie de página: Pre: Prueba previa D3, D6, y D15; Días 3, 8 (antes de la dosificación) y 15

1 Id-Prueba: Dunnell 2 caras p &lt; 0.05;

2 [d6: Prueba: Dunnell 2 caras p &lt; 0.01]

# ES 2 985 387 T3

[Fig. 83]

Sexo: Macho

Grupo	Animal No.	Linfocitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )				Recuento absoluto ( $10^3/\mu\text{L}$ )								
		Célula T		Célula T CD4		Célula T CD8		Célula T Reguladora		Célula NK				
		Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	
0 + ingesta	CJ1M01	7.49	5.60	3.64	2.98	2.07	1.84	1.12	0.76	0.10	0.09	2.84	2.08	
	CJ1M02	6.42	5.03	4.46	2.78	1.75	0.96	2.29	1.53	0.05	0.04	1.17	1.53	
	CJ1M03	3.94	3.77	2.15	1.95	1.08	0.84	0.89	0.93	0.05	0.06	1.25	1.34	
		Media	5.92	4.80	3.43	2.57	1.63	1.21	1.43	1.07	0.07	0.06	1.75	1.65
		S.D.	1.78	0.94	1.15	0.55	0.51	0.55	0.75	0.40	0.03	0.03	0.94	0.38
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
5 - ingesta	CJ2M01	5.01	9.42	3.14	5.52	1.25	1.61	1.81	3.33	0.05	0.19	1.30	2.79	
	CJ2M02	7.23	10.34	3.84	5.37	1.65	2.01	1.81	2.65	0.06	0.17	1.96	3.56	
	CJ2M03	5.32	9.63	3.25	5.71	0.92	1.66	2.02	3.51	0.04	0.25	1.01	2.05	
		Media	5.87	9.80	3.41	5.57	1.27	1.76	1.81	3.16	0.05	0.20	1.43	2.89
		S.D.	1.24	0.48	0.36	0.18	0.37	0.22	0.21	0.45	0.01	0.04	0.50	0.76
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
10 - ingesta	CJ3M01	8.38	13.41	5.81	9.36	1.27	2.41	3.67	5.91	0.07	0.34	1.43	2.02	
	CJ3M02	6.25	17.73	4.05	11.70	1.15	2.94	2.44	6.61	0.04	0.34	1.00	2.71	
	CJ3M03	3.32	5.01	2.33	3.71	0.64	1.41	1.49	1.88	0.03	0.30	0.58	0.83	
		d*								d*		d*		
		Media	5.93	12.05	4.97	8.26	1.02	2.25	2.53	4.80	0.05	0.33	1.00	1.85
		S.D.	2.54	6.47	1.74	4.11	0.93	0.78	1.09	2.55	0.02	0.02	0.43	0.95
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

Nota general a pie de página: Pre: Prueba previa D15: Dia 15

1 [d- Prueba: Dunnell 2 caras p < 0.05]

2 [dd- Prueba: Dunnett 2 caras p < 0.01]

[Fig. 84]

Sexo: Macho

Grupo	Animal No.	Relación con la linea base (prueba previa, %)																				
		Célula T				Célula T CD4				Célula T CD8				Célula T Reguladora		Célula NK						
		Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15					
0 + ingesta	CJ1M01	1.00	1.16	1.16	1.08	1.00	1.25	1.24	1.18	1.00	1.01	1.06	0.89	1.00	1.15	1.15	1.23	1.00	0.87	0.90	0.97	
	CJ1M02	1.00	0.99	0.97	0.80	1.00	1.08	0.93	0.70	1.00	0.89	1.00	0.85	1.00	1.13	1.00	0.88	1.00	0.60	1.11	1.57	
	CJ1M03	1.00	1.28	1.10	0.93	1.00	1.41	1.09	0.81	1.00	1.20	1.17	1.10	1.00	1.31	1.00	1.15	1.00	0.52	0.91	1.12	
		Media	1.00	1.14	1.08	0.94	1.00	1.25	1.09	0.90	1.00	1.03	1.08	0.95	1.00	1.20	1.05	1.09	1.00	0.66	0.97	1.25
		S.D.	0.00	0.15	0.10	0.14	0.00	0.17	0.16	0.25	0.00	0.16	0.09	0.13	0.00	0.10	0.09	0.18	0.00	0.18	0.12	0.37
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
5 - ingesta	CJ2M01	1.00	1.38	0.97	0.95	1.00	2.21	0.91	0.68	1.00	0.78	1.00	1.10	1.00	4.40	2.00	2.00	1.00	0.17	1.08	1.14	
	CJ2M02	1.00	1.44	1.05	0.98	1.00	1.81	1.07	0.85	1.00	1.14	1.03	1.03	1.00	4.50	3.25	2.00	1.00	0.23	1.06	1.26	
	CJ2M03	1.00	1.28	1.03	0.97	1.00	1.80	0.94	0.80	1.00	1.04	1.07	0.95	1.00	4.38	3.13	3.25	1.00	0.36	0.94	1.12	
		d*								d*		d*		d*		d*		d*		d*		
		Media	1.00	1.37	1.02	0.97	1.00	1.94	0.97	0.84	1.00	0.99	1.03	1.03	1.00	4.43	2.79	2.42	1.00	0.25	1.03	1.17
		S.D.	0.00	0.08	0.04	0.02	0.00	0.23	0.09	0.16	0.00	0.19	0.04	0.07	0.00	0.06	0.69	0.72	0.00	0.10	0.08	0.08
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
10 - ingesta	CJ3M01	1.00	1.17	1.05	1.01	1.00	2.15	1.20	1.18	1.00	0.79	1.04	1.01	1.00	5.13	3.75	3.13	1.00	0.38	0.82	0.88	
	CJ3M02	1.00	1.33	1.00	1.01	1.00	1.54	0.74	0.90	1.00	1.25	1.08	0.96	1.00	4.67	2.67	3.17	1.00	0.24	0.93	0.96	
	CJ3M03	1.00	1.28	1.09	1.05	1.00	2.43	1.24	1.47	1.00	0.75	1.00	0.84	1.00	7.60	4.60	5.90	1.00	0.17	0.61	0.94	
		d*								d*		d*		d*		d*		d*		d*		
		Media	1.00	1.26	1.05	1.02	1.00	2.04	1.06	1.18	1.00	0.93	1.04	0.94	1.00	5.80	3.67	4.07	1.00	0.26	0.79	0.93
		S.D.	0.00	0.08	0.05	0.02	0.00	0.46	0.28	0.29	0.00	0.28	0.04	0.09	0.00	1.58	0.97	1.59	0.00	0.11	0.16	0.04
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

Nota general a pie de página: Pre: Prueba previa D3, D8, y D15: Días 3, 8 (antes de la dosificación) y 15

1 [d- Prueba: Dunnell 2 caras p < 0.05]

2 [dd- Prueba: Dunnett 2 caras p < 0.01]

ES 2 985 387 T3

[Fig. 85]

Nota: Generar a pie de página. Pre-Prueba niveles D3, D8, y D16; Días 3, 6 (antes de la dosificación) y 16. Trig. Celular T-reguladora  
2 folic. Preueba: Dianette 2 cápsulas D < 0.011  
1 folic. Preueba: Dianette 2 cápsulas D < 0.011

Sexo: Macho

[Fig. 86]

Recuento absoluto en cada tipo de célula (10 <sup>3</sup> LL)																			
Grupo	Animal No.	K67 + Célula T			K67 + Célula T CD4			K67 + Célula T CD8			K67 + Treg			ICOS + Treg			K67 + Célula NK		
		Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	Pre	D15	
0 mg/kg/día	CJIM01	0.35	0.31	0.19	0.15	0.07	0.07	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.20	0.20			
	CJIM02	0.49	0.28	0.13	0.10	0.27	0.11	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.24	0.13			
	CJIM03	0.22	0.33	0.08	0.13	0.11	0.15	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.19	0.34				
Media		0.35	0.31	0.13	0.13	0.15	0.11	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.21	0.22				
S.D.		0.14	0.03	0.06	0.03	0.11	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.11				
N		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
5 mg/kg/día	CJ2M01	0.33	1.71	0.12	0.24	0.16	1.15	0.02	0.12	0.02	0.03	0.02	0.10	0.11	1.26				
	CJ2M02	0.25	1.32	0.09	0.23	0.09	0.75	0.02	0.07	0.02	0.05	0.03	0.07	0.23	1.85				
	CJ2M03	0.32	1.80	0.11	0.29	0.16	1.27	0.02	0.12	0.01	0.06	0.02	0.07	0.08	0.93				
Media		0.30	1.61	0.11	0.25	0.14	1.06	0.02	0.10	0.02	0.07	0.02	0.14	0.14	1.35				
S.D.		0.04	0.26	0.02	0.03	0.04	0.27	0.00	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.08	0.47				
N		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3					
10 mg/kg/día	CJ3M01	0.66	3.03	0.16	0.44	0.35	2.18	0.03	0.19	0.03	0.07	0.04	0.08	0.09	0.48				
	CJ3M02	0.37	3.45	0.10	0.39	0.18	2.15	0.01	0.16	0.01	0.11	0.02	0.15	0.13	1.19				
	CJ3M03	0.23	1.20	0.07	0.29	0.12	0.70	0.01	0.18	0.01	0.11	0.02	0.15	0.06	0.42				
Media		0.42	2.58	0.11	0.37	0.22	4 <sup>a</sup>	0.02	0.18	0.02	0.10	0.03	0.13	0.09	0.70				
S.D.		0.22	1.21	0.05	0.08	0.12	0.85	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.04	0.43					
N		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3						

Nota general a pie de página: Pre: Prueba previa D15; Dia 15: Célula T Reguladora

1[d]: Prueba: Dunnett 2 caras p &lt; 0.05

2[d]: Prueba: Dunnett 2 caras p &lt; 0.01

[Fig. 87]

Relación con la línea de base (prueba previa, %)																													
Grupo	Animal No.	Ki67 + Célula T				Ki67 + Célula T CD4				Ki67 + Célula T CD8				Ki67 + Treg				ICOS + Treg				Ki67 + Célula NK							
		Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15	Pre	D3	D8	D15				
0	CJMK01	100	0.75	0.55	1.07	100	0.62	0.33	0.65	100	0.92	1.14	1.45	100	0.76	0.76	0.76	100	0.73	0.71	0.74	100	0.74	0.68	0.70	100	2.71	2.33	1.37
mg/kg/día	CJMK02	100	0.75	0.70	0.92	100	0.95	0.97	1.43	100	0.62	0.56	0.64	100	1.14	1.30	1.56	100	0.95	1.79	1.47	100	0.76	1.41	1.38	100	0.47	0.54	0.41
	CJMK03	100	0.71	1.25	1.66	100	0.71	0.56	2.01	100	0.67	1.40	1.35	100	0.70	0.83	1.36	100	0.66	0.87	1.30	100	0.72	0.73	1.13	100	1.92	2.39	1.65
	Media	100	0.75	0.97	1.22	100	0.76	0.32	1.43	100	0.74	1.03	1.15	100	0.87	1.17	1.26	100	0.80	1.12	1.17	100	0.74	0.97	1.00	100	1.40	1.82	1.14
	S.D.	0.00	0.04	0.28	0.39	0.00	0.17	0.08	0.50	0.00	0.16	0.43	0.45	0.00	0.24	0.63	0.46	0.00	0.17	0.58	0.38	0.00	0.02	0.39	0.24	0.00	1.17	1.12	0.65
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
5	CZMK01	100	1.63	3.09	2.93	100	1.35	1.39	1.58	100	2.11	3.23	3.37	100	1.04	1.71	1.53	100	0.94	1.45	1.27	100	0.86	1.15	1.35	100	3.23	6.29	5.21
mg/kg/día	CZMK02	100	2.21	5.59	3.73	100	2.54	4.20	2.13	100	2.56	8.92	5.45	100	1.34	2.23	1.49	100	1.28	2.22	1.23	100	0.94	1.56	1.01	100	3.46	5.10	4.55
	CZMK03	100	1.35	4.94	3.19	100	2.44	1.47	1.00	1.65	6.74	4.48	1.00	0.72	1.57	1.26	1.00	0.71	1.25	0.78	100	0.72	1.16	0.71	100	1.96	6.80	5.42	
	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>				
	Media	100	1.73	4.81	3.26	100	1.64	2.76	1.73	100	2.11	6.96	4.44	100	1.03	1.84	1.43	100	0.96	1.64	1.09	100	0.84	1.29	0.92	100	2.75	6.06	5.03
	S.D.	0.00	0.44	0.86	0.41	0.00	0.80	1.29	0.36	0.00	0.46	1.86	1.05	0.00	0.31	0.35	0.15	0.00	0.23	0.51	0.27	0.00	0.11	0.23	0.19	0.00	1.04	0.87	0.47
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
10	CZMK01	100	1.82	4.47	2.83	100	1.37	2.67	1.30	100	2.47	5.89	3.84	100	0.94	1.84	1.30	100	0.76	1.36	0.59	100	0.63	1.10	0.53	100	2.10	7.03	4.03
mg/kg/día	CZMK02	100	2.38	6.29	3.24	100	2.60	4.01	1.49	100	2.39	8.43	4.33	100	1.47	1.93	1.34	100	1.18	1.68	0.96	100	0.97	1.39	0.91	100	2.39	4.55	3.46
	CZMK03	100	2.35	5.57	3.30	100	2.23	2.54	1.92	100	2.34	7.87	4.47	100	1.17	1.72	1.59	100	0.82	1.20	1.03	100	0.57	0.91	0.90	100	3.02	7.18	4.74
	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>	d <sup>a</sup>				
	Media	100	2.18	5.44	3.14	100	2.07	3.11	1.64	100	2.40	7.40	4.21	100	1.19	1.76	1.41	100	0.92	1.41	0.86	100	0.76	1.13	0.78	100	2.50	6.25	4.07
	S.D.	0.00	0.32	0.92	0.22	0.00	0.63	0.70	0.25	0.00	0.07	1.33	0.33	0.00	0.27	0.15	0.16	0.00	0.23	0.24	0.21	0.00	0.19	0.24	0.22	0.00	0.47	1.48	0.64
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			

Nota general a pie de página: Pre: Prueba previa D3, D8, y D15; Dias 3, 8 (antes de la dosificación) y 15 Treg: Célula T Reguladora

1. d<sup>a</sup>: Prueba Dunnnett 2 caras p < 0.05;2. [d<sup>a</sup>: Prueba Dunnnett 2 caras p < 0.01].

[Fig. 88]

Día(s): 15 Relativo a la fecha de inicio

Sexo: Macho		0 mg/kg/dia	5 mg/kg/dia	10 mg/kg/dia
Hígado (g)	Media S.D. N	41.5 0.9 3	42.7 7.1 3	42.1 5.6 3
Hígado (%)	Media S.D. N	1.73 0.09 3	1.68 0.10 3	1.86 0.18 3
Bazo (g)	Media S.D. N	1.727 0.520 3	3.358 0.758 3	3.886 d <sup>a</sup> 1.087 3
Bazo (%)	Media S.D. N	0.072 0.023 3	0.132 0.025 3	0.171 d <sup>a</sup> 0.040 3
Páncreas (g)	Media S.D. N	4.27 0.54 3	4.27 1.20 3	3.24 0.38 3

[Fig. 89]

A

