

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 745**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2017** **PCT/EP2017/052550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2017** **WO17134305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2017** **E 17705564 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3411407**

54 Título: **Agentes de señalización biespecíficos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

05.02.2016 US 201662291769 P
05.02.2016 US 201662291772 P
05.02.2016 US 201662291774 P
05.02.2016 US 201662291776 P
05.02.2016 US 201662291779 P
13.05.2016 US 201662335880 P
13.05.2016 US 201662335965 P
13.05.2016 US 201662335968 P
13.05.2016 US 201662335979 P
13.05.2016 US 201662336030 P
23.06.2016 US 201662353607 P
24.10.2016 US 201662411805 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.10.2024

73 Titular/es:

ORIONIS BIOSCIENCES BV (33.3%)
Rijvisschestraat 120
9052 Zwijnaarde, BE;
VIB VZW (33.3%) y
UNIVERSITEIT GENT (33.3%)

72 Inventor/es:

KLEY, NIKOLAI;
TAVERNIER, JAN;
VAN LINT, SANDRA y
CAUWELS, ANJE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 981 745 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

Agentes de señalización biespecíficos y usos de los mismos

Campo

- 5 La presente invención se refiere, en parte, a proteínas quiméricas que pueden reclutar células efectoras y enviar una señalización para proporcionar efectos beneficiosos.

Antecedentes

- 10 El cáncer es un problema sanitario mundial que causa cerca de 7 millones de muertes al año en todo el mundo y que, hasta la fecha, ha resultado en gran medida intratable a pesar de los grandes avances de la medicina. Resulta frustrante que los cánceres parezcan desarrollar estrategias para eludir la detección y destrucción inmunitarias, eludiendo así la principal protección del organismo contra la enfermedad.

- 15 Recientemente se han desarrollado muchas inmunoterapias para redirigir el sistema inmunitario del cuerpo hacia los cánceres. La inmunoterapia ofrece la ventaja de la especificidad celular de la que carecen otras modalidades de tratamiento, tales como la quimioterapia y la radioterapia. Por ello, los procedimientos para mejorar la eficacia de las terapias inmunológicas pueden ser clínicamente beneficiosos. Por ejemplo, las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras desempeñan un papel central en la regulación de las respuestas inmunitarias de los linfocitos T. Sin embargo, a pesar de las impresionantes respuestas de los pacientes a los agentes dirigidos a estas moléculas coestimuladoras y coinhibidoras, incluidos, por ejemplo, los ensayos clínicos que condujeron a la aprobación de YERVOY, KEYTRUDA y OPDIVO, la terapia de inhibición de puntos de control sigue fracasando en la inmensa mayoría de los pacientes.

- 20 Además, la mayoría de los tratamientos contra el cáncer, incluidas las inmunoterapias, requieren tratamientos complejos con diversos agentes, cada uno de los cuales suele conllevar un complejo patrón de efectos secundarios que reduce la ventana terapéutica del paciente para el tratamiento y lo hace más susceptible a otras enfermedades.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de agentes inmunoterapéuticos mejorados, incluidos aquellos que puedan modular eficazmente el sistema inmunitario de forma multifuncional.

- 25 Garcin *et al.* (Nature Communications, 2013, 5:3016) divulgan proteínas de fusión de IFN α 2 mutante y un resto de transporte dirigido. Rossi *et al.* (Cancer Res., 2010, 70(19):7600-7609) divulgan IFN α 2 fusionado a un anticuerpo biespecífico.

Sumario

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

- 30 La presente invención se refiere a proteínas quiméricas que se utilizan en diversos procedimientos celulares de transporte dirigido. Las proteínas quiméricas tienen dos o más restos de transporte dirigido, seleccionadas entre un anticuerpo de dominio único (sdAb), fragmentos variables monocatenario (scFv) o Fab, que tienen dominios de reconocimiento que se unen específicamente a un antígeno o receptor de interés. La proteína quimérica comprende además un interferón alfa 2 humano (IFN α 2) mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con SEQ ID NO: 336, el IFN α 2 mutante tiene una o más mutaciones en las posiciones 144-154, en el que el IFN α 2 humano mutante tiene una afinidad o actividad reducida por su receptor en relación con el IFN α 2 humano de tipo salvaje, en el que la afinidad o actividad reducida del IFN α 2 humano mutante por su receptor puede ser restaurada por uno o más de los restos de transporte dirigido, y en el que el primer resto de transporte dirigido está unido al segundo resto de transporte dirigido y el segundo resto de transporte dirigido está unido al agente de señalización modificado. Los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 mutante se conectan opcionalmente mediante uno o más conectores.

- 45 En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido tienen dominios de reconocimiento que se unen específicamente a una diana (por ejemplo, antígeno, receptor) de interés, incluidas las que se encuentran en una o más células inmunitarias, que pueden incluir, entre otros, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), macrófagos antitumorales (por ejemplo, macrófagos M1), neutrófilos, linfocitos B y células dendríticas. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento se unen específicamente a una diana (por ejemplo, antígeno, receptor) de interés y reclutan eficazmente una o más células inmunitarias. En algunas realizaciones, las dianas (por ejemplo, antígenos, receptores) de interés pueden encontrarse en una o más células tumorales. En estas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas pueden reclutar una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula inmunitaria que pueda matar y/o suprimir una célula tumoral, a un sitio de acción (tal como, a modo de ejemplo no limitante, el microambiente tumoral).

- 50 Además, las presentes proteínas quiméricas no sólo pueden reclutar directa o indirectamente células que aumenten la probabilidad de un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto antitumoral, sino que las presentes proteínas quiméricas además pueden enviar una señalización importante a las células a través de IFN α 2. Además, el IFN α 2 está

mutado de tal manera que la señalización está controlada y proporciona una mayor seguridad (por ejemplo, no se produce a costa de la toxicidad sistémica). Más aún, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona diversas mutaciones del IFNa2 que pueden, por ejemplo, templar la actividad en un sitio de acción terapéutica (por ejemplo, en un receptor terapéutico) y también reducir o eliminar la unión inespecífica en un receptor no terapéutico.

Es decir, en algunas realizaciones, el IFNa2 tiene menos promiscuidad por receptores y presenta una acción específica más controlada.

En diversas realizaciones, el IFNa2 puede modular una o más células a las que se dirigen los restos de transporte dirigido (por ejemplo, células reclutadas, tales como células enfermas y/o células efectoras). Por ejemplo, el IFNa2 puede modular una o ambas células diana (y las células diana pueden ser efectoras y/o células de enfermedad), en función de si las células diana expresan un receptor para el IFNa2.

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas se utilizan en el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra, en el panel A, ratones C57BL/6 inoculados por vía subcutánea (50 µl) con 6×10^5 células tumorales de melanoma B16mCD20cl1. El tratamiento perilesional con 120 µg de un VHH anti-PD-L1 (120 µl) o una fusión de un VHH anti-PD-L1 con IFNalfa humano, mutante Q124R se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\pm 10 \text{ mm}^2$ medido con calibrador. Las curvas están en el mismo orden (de arriba a abajo) que en la leyenda de la figura que identifica los tipos de tratamiento (por ejemplo, PBS es la curva superior, anti-PD-L1 es la curva central, y la curva inferior es la fusión de un VHH anti-PD-L1 con IFNalfa humano, mutante Q124R). En el panel B: Se inocularon por vía subcutánea (50 µl) 6×10^5 células tumorales de melanoma B16mCD20cl1 a compañeros de camada C57BL/6. El tratamiento perilesional con 30 µg de las construcciones indicadas (100 µl) se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\pm 10 \text{ mm}^2$ medido con calibrador. Las flechas negras indican el programa de tratamiento. Las curvas están en el mismo orden (de arriba a abajo) que en la leyenda de la figura que identifica los tipos de tratamiento (por ejemplo, la curva superior es PBS, la curva central es una fusión de un VHH anti-CD20 con IFNalfa humano, mutante Q124R, y la curva inferior es una construcción biespecífica: VHH anti-CD20-IFNalfa humano, mutante Q124R-anti-VHH PD-L1).

La figura 2 muestra un experimento en el que se inocularon ratones C57BL/6 por vía subcutánea (50 µl) con 6×10^5 células tumorales de melanoma B16mCD20cl1. El tratamiento perilesional con 30 µg de las quimeras indicadas (100 µl) se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\pm 10 \text{ mm}^2$ medido con calibrador. La fila superior de flechas indica el programa de tratamiento. La fila inferior de flechas indica la inyección perilesional de 120 µg de VHH anti-PD-L1 (120 µl). Las curvas están en el mismo orden (de arriba abajo) que en la leyenda de la figura que identifica los tipos de tratamiento. "PD-L1 Q124R" es una fusión de un VHH anti-PD-L1 con IFNalfa humano, mutante Q124R; "Clec9A-Q124R" es una fusión de un VHH anti-Clec9A con IFNalfa humano, mutante Q124R; y "Clec9A-Q124R-PD-L1" es una construcción biespecífica de VHH anti-Clec9A-IFNalfa humano, mutante Q124R-VHH anti-PD-L1.

La figura 3 muestra diversos parámetros de seguridad de la quimera biespecífica mCD20-Q124R-PD-L1. En los paneles B-G, el orden de los histogramas es, de izquierda a derecha, PBS, "CD20-Q124R", una fusión de un VHH anti-CD20 con IFNalfa humano, mutante Q124R, y una construcción biespecífica de VHH anti-CD20-IFNalfa humano, mutante Q124R-VHH anti-PD-L1 ("CD20-Q124R-PD-L1").

La figura 4 muestra diversos parámetros de seguridad de la quimera biespecífica Clec9A-Q124R-PD-L1. En los paneles B-G, el orden de los histogramas es, de izquierda a derecha, PBS, anti-PD-L1, "Clec9A-Q124R", una fusión de un VHH anti-Clec9A con IFNalfa humano, mutante Q124R, una construcción biespecífica de VHH anti-Clec9A-IFNalfa humano, mutante Q124R-VHH anti-PD-L1 ("Clec9A-Q124R-PD-L1"), y "PD-L1-Q124R", una fusión de un VHH anti-PD-L1 con un IFNalfa humano, mutante Q124R.

La figura 5 muestra un estudio de crecimiento tumoral en ratones en el que se inocularon ratones C57BL/6 por vía subcutánea (50 µl) con 6×10^5 células tumorales de melanoma B16. El tratamiento perilesional con 30 µg de los agentes de tratamiento indicados (100 µl) se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño de $\pm 10 \text{ mm}^2$ medido con calibrador. El gráfico muestra la evolución del tamaño del tumor a lo largo del tiempo indicado.

La figura 6 muestra un estudio de crecimiento tumoral en ratones en el que se inocularon ratones C57BL/6 por vía subcutánea con células tumorales de melanoma B16. El tratamiento perilesional con los agentes terapéuticos indicados se inició cuando los tumores alcanzaron determinado tamaño medido con calibrador. El gráfico muestra la evolución del tamaño del tumor a lo largo del tiempo indicado.

La figura 7 muestra un estudio de crecimiento tumoral en ratones en el que ratones sin el gen Batf3 que carecen de células dendríticas de presentación cruzada fueron inoculados por vía subcutánea con células tumorales de melanoma B16. El tratamiento perilesional con los agentes terapéuticos indicados se inició

cuando los tumores alcanzaron determinado tamaño medido con calibrador. El gráfico muestra la evolución del tamaño del tumor a lo largo del tiempo indicado.

La figura 8, paneles A-C, muestran un estudio de crecimiento tumoral en ratones que fueron inoculados con células de tumor mamario 4T1. Los ratones fueron tratados con los agentes indicados. Los gráficos muestran la evolución del tamaño del tumor a lo largo del tiempo indicado.

La figura 9 muestra un estudio de crecimiento tumoral en ratones que fueron inoculados con células tumorales de melanoma B16 (panel A) o células de tumor mamario 4T1 (paneles B y C). A continuación, los ratones fueron tratados con los agentes indicados con o sin doxorubicina. Los gráficos muestran la evolución del tamaño del tumor a lo largo del tiempo indicado.

La figura 10 muestra un estudio de crecimiento tumoral en ratones que fueron inoculados con células de tumor mamario 4T1 en ratones. A los ratones sin tumores de la figura 9, panel B, se les volvieron a inyectar 10^5 células 4T1 y se controló el crecimiento tumoral. El gráfico muestra la evolución del tamaño del tumor a lo largo del tiempo indicado.

La figura 11 muestra la eficacia de las quimeras biespecíficas utilizando un modelo de encefalomyelitis autoinmunitaria experimental ("experimental autoimmune encephalomyelitis", EAE). El panel A muestra un esquema del diseño experimental. El panel B muestra la puntuación clínica de los ratones tratados con 100 UI de los agentes indicados. El panel C muestra la puntuación clínica de los ratones tratados con 1000 UI de los agentes indicados. El panel D demuestra que la quimera biespecífica Clec9A-CD20-hIFN α 2-Q124R es segura y no induce linfopenia. Las barras del histograma representan, de izquierda a derecha, el tratamiento con PBS, una fusión mono-específica de anti-Clec9A con IFN alfa humano Q124R modificado, una fusión mono-específica de anti-mCD20 con IFN alfa humano Q124R modificado, una fusión mono-específica de anti-Bcl10 con IFN alfa humano Q124R modificado, IFN de tipo salvaje, una combinación de la fusión mono-específica de anti-Clec9A con IFN alfa humano Q124R modificado y la fusión mono-específica de anti-mCD20 con IFN alfa humano Q124R modificado, la quimera biespecífica Clec9A-hIFN α 2-Q124R-CD20, y la quimera biespecífica Clec9A-CD20-hIFN α 2-Q124R. El panel E compara la eficacia de la quimera biespecífica Clec9A-hIFN α 2-Q124R-CD20 en dosis de 100 UI y 1000 UI. El panel F compara la eficacia de la quimera biespecífica Clec9A-CD20-hIFN α 2-Q124R en dosis de 100 UI y 1000 UI.

La figura 12 muestra la eficacia de la quimera biespecífica Clec9A-CD20-hIFN α 2-Q124R en la dosis de 5000 UI. El panel A muestra el efecto de la quimera biespecífica sobre la puntuación clínica. El panel B muestra el efecto de la quimera biespecífica sobre el peso. El panel C muestra el efecto de la quimera biespecífica sobre la incidencia y el inicio de la enfermedad.

La figura 13 muestra una evaluación de la proliferación y activación de linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos del antígeno tumoral tanto en los ganglios linfáticos que drenan el tumor (paneles A y B) como en el bazo (paneles C y D), dos órganos primordiales en la inducción de la inmunidad antitumoral. Los ratones portadores de B16-OVA fueron inyectados una vez con PBS, la quimera biespecífica de VHH anti-Clec9A/VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R o la misma quimera biespecífica en combinación con doxorubicina un día después de la transferencia adoptiva de células OT-I CD8 $^{+}$ marcadas con CFSE portadoras de un TCR de CD8 que reconoce el antígeno modelo ovoalbúmina (OVA), presente en las células tumorales B16-OVA. La proliferación y activación de las células OT-I CD8 $^{+}$ marcadas con CFSE se evaluó 4 días después mediante citometría de flujo, mostrando una mayor proliferación y estado de activación de las células proliferadas en los ratones que recibieron la quimera biespecífica de VHH anti-Clec9A/VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R o la misma quimera biespecífica en combinación con doxorubicina, en comparación con la inyección perilesional con PBS (paneles A y C). Los datos muestran el porcentaje de células OT-I CD8 $^{+}$ que han sufrido al menos una división. Se incluye un perfil representativo de citometría de flujo. Además, como se muestra en los paneles B y D, se realizó un análisis de citometría de flujo de la expresión de CD44 y CD62L en linfocitos T CD8 $^{+}$ CFSE $^{+}$ que mostraban un fenotipo de linfocito T activado y de memoria tras la administración de la quimera biespecífica de VHH anti-Clec9A/VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R sola o en combinación con doxorubicina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ en comparación con los animales tratados con PBS mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

La figura 14 muestra células B16 estimulados con 100 ng/ml de quimeras (o se dejaron sin estimular) y teñidas para fosfo STAT1. Los datos se representan como intensidades fluorescentes medias. Las quimeras analizadas son VHH anti-Sirp1 α /VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R, VHH anti-DNAM/VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R; y una fusión mono-específica de VHH anti-Bcl10 con IFN alfa humano Q124R modificado (control inespecífico).

La figura 15 muestra, en los paneles A, B y C, la localización de CD8 humano de quimeras mono-específicas (VHH anti-CD8 humano/IFN humano R149A). En el panel A se muestra un gráfico de cebrado de la tinción de CD8 frente a pSTAT1 de PBMC estimuladas.

Paneles B y C: se representan las intensidades medias de fluorescencia ("mean fluorescent intensities", MFI) de la tinción con pSTAT1 de las células positivas para CD8 (panel B) o negativas para CD8 (panel C). La figura 15 muestra, en los paneles D, E, y F la localización de CD8 humano de quimeras biespecíficas (VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A).

La figura 16 muestra un experimento en el que se estimularon células MDA-MB-321 con una dilución en serie de quimeras y se tiñeron para fosfo STAT1. Los datos se representan como intensidades fluorescentes medias (MFI). Las quimeras estudiadas fueron VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A; VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120R; VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A; VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120R; y VHH anti-Bcl10 humano/IFN humano R149A. Como referencia, este es el orden de las construcciones en la figura 16, de arriba abajo, al ver el punto de 4 ng/ml en el eje X.

La figura 17 muestra células Daudi, Jurkat y Wish estimuladas con una dilución en serie de quimeras scFv y teñidas para fosfo STAT1. Los datos se representan como intensidades fluorescentes medias (MFI). Las quimeras estudiadas fueron scFv anti-CD20 humano/scFv anti-CD3 humano/IFN humano R149A. Al ver los gráficos en el punto 1000 del eje x, el orden de las curvas es células Jurkat, Daudi y Wish.

La figura 18 muestra los efectos antitumorales de una quimera biespecífica de VHH anti-Clec9a humano/VHH anti-PDL1 humano/IFN humano-R149A en un tumor humano (RL) cultivado en ratones humanizados. Con referencia al día 18 en el eje X, las construcciones estudiadas fueron, de arriba abajo: PBS (control); quimera biespecífica VHH anti-Clec9a humano/VHH anti-PDL1 humano/IFN humano-R149A; y quimera biespecífica VHH anti-Clec9a humano/VHH anti-PDL1 humano/IFN humano-R149A más ligando de tirosina cinasa 3 similar al FMS (FLT3L).

La figura 19 muestra un ensayo de señalización de pSTAT1 en células dendríticas humanas. Las quimeras estudiadas fueron VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A y VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120R. Se estudiaron dos dosis de los agentes: 100 ng/ml y 500 ng/ml. PBS fue el control y los datos se expresan como cambio en número de veces del porcentaje de células dendríticas pSTAT1⁺ (los datos son la media de un conjunto de datos por triplicado).

Descripción detallada

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que las proteínas quiméricas biespecíficas con IFNa2 humano portadoras de mutaciones terapéuticamente beneficiosas proporcionan propiedades terapéuticas beneficiosas y efectos secundarios reducidos. En diversas realizaciones, estas proteínas quiméricas pueden reclutar las células apropiadas (por ejemplo, células inmunitarias) al sitio que necesita la acción terapéutica (por ejemplo, una célula tumoral) a través de los restos de transporte dirigido duales y, además, enviar una o más señales importantes para conseguir una señal terapéutica a través del IFNa2 modificado. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas quiméricas. La administración de las proteínas quiméricas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención consigue reducir significativamente los efectos secundarios en comparación con el agente soluble de tipo salvaje.

Proteínas quiméricas

En diversas realizaciones, la presente invención se refiere a una proteína quimérica biespecífica o multifuncional que tiene dos o más restos de transporte dirigido, seleccionados de un anticuerpo de dominio único (sdAb), fragmentos variables monocatenarios (scFv) o Fab, que tienen dominios de reconocimiento que se unen específicamente a un antígeno o receptor de interés, que opcionalmente, y directa o indirectamente, reclutan células de interés y/o modulan la función de las células reclutadas, y un IFNa2 humano mutante que comprende una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad con SEQ ID NO: 336, que porta una o más mutaciones en las posiciones 144-154 que hacen que el agente de señalización sea adecuado para un uso farmacéutico con efectos secundarios mínimos (por ejemplo, mínimos efectos similares a una tormenta de citoquinas, síntomas similares a la gripe, pensamientos suicidas, efectos secundarios inespecíficos, entre otros).

En diversas realizaciones, la proteína quimérica, entre otras características, recluta directa o indirectamente una o más células efectoras a una célula enferma, por ejemplo, a través de los restos de transporte dirigido, y además envía una señal a la célula efectora para modular la célula enferma de una manera terapéuticamente pertinente. En diversas realizaciones, la proteína quimérica, entre otras características, recluta directa o indirectamente una o más células efectoras a una célula enferma, por ejemplo, a través de los restos de transporte dirigido, y además envía una señal a la célula enferma para modular la célula efectora de una manera terapéuticamente pertinente. En diversas realizaciones, la proteína quimérica, entre otras características, recluta directa o indirectamente una o más células efectoras a una célula enferma, por ejemplo, a través de los restos de transporte dirigido, y además envía una señal a la célula efectora para modular la célula efectora de una manera terapéuticamente pertinente. En diversas realizaciones, la proteína quimérica, entre otras características, recluta directa o indirectamente una o más células

efectoras a una célula enferma, por ejemplo, a través de los restos de transporte dirigido, y además envía una señal a la célula enferma para modular la célula enferma de una manera terapéuticamente pertinente. En algunas realizaciones, el agente señalizador afecta a la célula efectora y/o a la célula enferma.

En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica proporciona al menos dos beneficios terapéuticos cuando se utiliza de modo farmacéutico. Por ejemplo, la presente proteína quimérica puede reclutar eficazmente células apropiadas a un sitio que requiere tratamiento (a modo de ejemplo no limitante, células efectoras inmunitarias a un tumor, por ejemplo, el microambiente tumoral) y enviar una o más señales a las células (por ejemplo, células inmunitarias efectoras y/o células tumorales) para promover un efecto reductor o eliminador del cáncer (por ejemplo, proporcionar estimulación de células inmunitarias a partir del IFN α 2, proporcionar señales inmunitarias coestimuladoras a través de los dominios de transporte dirigido, proporcionar reducción o silenciamiento de señales inmunitarias coinhibidoras a través de los dominios de transporte dirigido, etc.). En consecuencia, como se describe en el presente documento, la presente proteína quimérica proporciona una plataforma de opciones terapéuticamente pertinentes para el tratamiento eficaz de enfermedades a través del sistema inmunitario, incluidos, entre otros, el tratamiento del cáncer.

Además, la presente proteína quimérica, en diversas realizaciones, tiene propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas que la hacen especialmente adecuada para su uso en terapias. Por ejemplo, en diversas realizaciones, incluidas aquellas en las que se utilizan formatos basados en anticuerpos más pequeños para el transporte dirigido (como se describe en otro punto del presente documento), la presente proteína quimérica tiene un peso molecular que permite evitar la excreción renal para conseguir efectos terapéuticos a una dosis baja (por ejemplo, sin pérdida de la sustancia terapéutica a través del riñón). Por ejemplo, la presente proteína quimérica, en diversas realizaciones, está diseñada para tener una masa molecular de aproximadamente 50 KDa, o aproximadamente 60 KDa, o aproximadamente 70 KDa, o aproximadamente 80 KDa, o aproximadamente 90 KDa, o aproximadamente 100 KDa. En diversas realizaciones, las presentes construcciones evaden la filtración renal de tal manera que no requieren procedimientos externos de extensión de la semivida.

En diversas realizaciones, cada una de las proteínas quiméricas individuales puede conjugarse y/o fusionarse con otro agente para prolongar la semivida o mejorar de otro modo las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas. En algunas realizaciones, las proteínas quiméricas pueden fusionarse o conjugarse con una o más de PEG, XTEN (por ejemplo, como rPEG), ácido polisiálico (POLYXEN), albúmina (por ejemplo, seroalbúmina humana o HAS ["human serum albumin"]), proteína similar a la elastina ("elastin-like protein", ELP), PAS, HAP, GLK, CTP, transferrina y similares. En algunas realizaciones, la proteína quimérica puede fusionarse o conjugarse con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fc. Por ejemplo, la proteína quimérica puede fusionarse con el N-terminal o el C-terminal del dominio Fc de la inmunoglobulina (Ig) G humana. En diversas realizaciones, cada una de las proteínas quiméricas individuales se fusiona con uno o más de los agentes descritos en BioDrugs (2015), 29:215-239.

Tal como se describe en el presente documento, la presente proteína quimérica puede tener una seguridad mejorada debido a una o más modificaciones, por ejemplo, mutaciones. En diversas realizaciones, una seguridad mejorada significa que la presente proteína quimérica proporciona menor toxicidad (por ejemplo, toxicidad sistémica y/o toxicidad asociada a tejidos u órganos); y/o efectos secundarios disminuidos o sustancialmente eliminados; y/o tolerabilidad aumentada, acontecimientos adversos disminuidos o sustancialmente eliminados; y/o efectos inespecíficos reducidos o sustancialmente eliminados; y/o una ventana terapéutica aumentada.

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica aumenta el índice terapéutico (por ejemplo, en aproximadamente 2 veces, en aproximadamente 5 veces, en aproximadamente 10 veces, en aproximadamente 25 veces, en aproximadamente 50 veces, en aproximadamente 100 veces, en aproximadamente 200 veces o más) de cualquier proteína terapéutica (por ejemplo, basada en una proteína natural o modificada o fragmento de la misma) reduciendo la toxicidad general de la proteína y manteniendo o aumentando el efecto selectivo de la proteína en las células o tejidos diana. Por ejemplo, este aumento del índice terapéutico (por ejemplo, en aproximadamente 2 veces, en aproximadamente 5 veces, en aproximadamente 10 veces, en aproximadamente 25 veces, en aproximadamente 50 veces, en aproximadamente 100 veces, en aproximadamente 200 veces, o más) puede ser del agente de señalización modificado (por ejemplo, en relación con el agente de señalización de tipo salvaje, o en relación con un agente de señalización de tipo salvaje en el contexto de una proteína de fusión con un único resto de transporte dirigido, o en relación con un agente de señalización de tipo salvaje en el contexto de una proteína de fusión con más de un resto de transporte dirigido).

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica permite la unión eficiente de los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 a sus receptores. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína quimérica permite la unión eficiente de uno de los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 a receptores sobre la misma célula (por ejemplo, diferentes receptores), así como la unión eficiente del otro resto de transporte dirigido a otra célula. Tal como se describe en otras partes del presente documento, en diversas realizaciones, el IFN α 2 está mutado para proporcionar una actividad atenuada, y la unión del resto de transporte dirigido y el IFN α 2 a receptores sobre la misma célula es secuencial, por ejemplo, unión del resto de transporte dirigido/receptor antes de la unión IFN α 2/receptor. Por ejemplo, el IFN α 2 por sí mismo es significativamente menos activo en su forma mutada (por ejemplo, en relación con el tipo salvaje) porque no puede unirse eficientemente a su receptor o receptores. En consecuencia, las proteínas quiméricas de la invención

son útiles para evitar efectos secundarios no deseados causados por la unión del IFNa2 a su receptor natural en células no diana. Sin embargo, el IFNa2 es activo en las células diana porque el resto o restos de transporte dirigido compensan la falta/insuficiencia de unión (por ejemplo, sin limitación y/o aversez) necesaria para una activación sustancial. En diversas realizaciones, las proteínas quiméricas de la presente invención tienen un IFNa2 mutante que hace que el IFNa2 sea inactivo mientras se está dirigiendo al sitio de actividad terapéutica (por ejemplo, en contacto con una célula diana, incluida una célula tumoral) a través del organismo, y que produzca su efecto sustancialmente en tipos de células específicamente establecidas como diana, lo que reduce en gran medida los efectos secundarios no deseados.

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas tienen bioactividad selectiva, por ejemplo, bioactividad terapéuticamente pertinente, hacia células diana (por ejemplo, células tumorales), pero no hacia células que no son diana (por ejemplo, células normales, no tumorales).

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas proporcionan actividad sinérgica y/o efectos terapéuticos. En tales realizaciones, la actividad y/o los efectos terapéuticos de las proteínas quiméricas tienen efectos terapéuticos mejorados, por ejemplo, son sinérgicamente mayores, que los efectos terapéuticos de los componentes individuales (es decir, los restos de transporte dirigido y el agente de señalización) administrados solos o combinados mediante coadministración.

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas tienen dos o más restos de transporte dirigido y el IFNa2 conectados entre sí a través de diferentes configuraciones. En una realización, ambos restos de transporte dirigido están unidos al amino-terminal del IFNa2. Por ejemplo, el amino-terminal del IFNa2 puede estar unido al carboxi-terminal de uno de los restos de transporte dirigido, que a su vez está unido al otro resto de transporte dirigido (por ejemplo, a través de su amino-terminal). En otra realización, ambos restos de transporte dirigido están unidos al carboxi-terminal del IFNa2. Por ejemplo, el carboxi-terminal del IFNa2 puede estar unido al amino-terminal de uno de los restos de transporte dirigido, que a su vez está unido al otro resto de transporte dirigido (por ejemplo, a través de su carboxi-terminal).

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas están en forma de una proteína de fusión que tiene los componentes descritos en el presente documento.

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas tienen dos o más restos de transporte dirigido que se dirigen a diferentes antígenos o receptores, y un resto de transporte dirigido puede estar atenuado para su antígeno o receptor, por ejemplo, el resto de transporte dirigido se une a su antígeno o receptor con una baja afinidad o aversez (incluidas, por ejemplo, con una afinidad o aversez que es menor que la afinidad o aversez que el otro resto de transporte dirigido tiene por su antígeno o receptor, por ejemplo, la diferencia entre las afinidades de unión puede ser aproximadamente 10 veces, o 25 veces, o 50 veces, o 100 veces, o 300 veces, o 500 veces, o 1000 veces, o 5000 veces; por ejemplo, el resto de transporte dirigido de menor afinidad o aversez puede unirse a su antígeno o receptor con una K_D en el intervalo de nM intermedia a alta o μM de baja a intermedia, mientras que el resto de transporte dirigido de mayor afinidad o aversez puede unirse a su antígeno o receptor con una K_D en el intervalo de pM intermedia a alta o nM de baja a intermedia). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente quimera comprende un resto de transporte dirigido atenuado que se dirige contra un antígeno o receptor promiscuo, lo que puede mejorar el transporte dirigido a una célula de interés (por ejemplo, a través del otro resto de transporte dirigido) y evitar efectos en múltiples tipos de células, incluidas las que no son diana de la terapia (por ejemplo, mediante la unión del antígeno o receptor promiscuo con una afinidad mayor que la proporcionada en estas realizaciones).

En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína quimérica como se describe en el presente documento.

Reclutamiento celular por el resto de transporte dirigido

En diversas realizaciones, las proteínas quiméricas de la presente invención tienen uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen a diferentes células (por ejemplo, para crear una sinapsis) o a la misma célula (por ejemplo, para obtener un agente de señalización o un efecto terapéutico más concentrado). El antígeno diana o receptor de interés puede encontrarse sobre una o más células inmunitarias, que pueden incluir, entre otras, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), macrófagos antitumorales (por ejemplo, macrófagos M1), linfocitos B, células dendríticas o subconjuntos de las mismas. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento se unen específicamente a un antígeno diana o receptor de interés y reclutan eficazmente, directa o indirectamente, una o más células inmunitarias. En algunas realizaciones, el antígeno diana o receptor de interés puede encontrarse sobre una o más células tumorales. En estas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas pueden reclutar directa o indirectamente una célula inmunitaria, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico). En algunas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas pueden reclutar directa o indirectamente una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula inmunitaria que puede matar y/o suprimir una célula tumoral, a un sitio de acción (tal como, a modo de ejemplo no limitante, el microambiente tumoral).

En diversas realizaciones, las proteínas quiméricas tienen restos de transporte dirigido con dominios de reconocimiento que se unen específicamente a un antígeno o receptor diana que forma parte de una estructura no celular. En algunas realizaciones, el antígeno o receptor no es un componente integral de una célula o estructura celular intacta. En algunas realizaciones, el antígeno o receptor es un antígeno o receptor extracelular. En algunas realizaciones, la diana es un marcador no proteico, no celular, incluidos, entre otros, ácidos nucleicos, incluidos ADN o ARN, como, por ejemplo, ADN liberado de células tumorales necróticas, o depósitos extracelulares, tales como colesterol.

En algunas realizaciones, el antígeno diana o receptor de interés forma parte del componente no celular del estroma o de la matriz extracelular (MEC) o de los marcadores asociados a ellos. Tal como se utiliza en el presente documento, el estroma se refiere a la estructura conectiva y de soporte de un tejido u órgano. El estroma puede incluir una compilación de células, tales como fibroblastos/miofibroblastos, células gliales, epiteliales, adiposas, inmunitarias, vasculares, de músculo liso e inmunitarias, junto con la matriz extracelular (MEC) y moléculas extracelulares. En diversas realizaciones, el antígeno diana o receptor de interés forma parte del componente no celular del estroma, tal como la matriz extracelular y las moléculas extracelulares. En el presente documento, la MEC se refiere a los componentes no celulares presentes en todos los tejidos y órganos. La MEC se compone de un amplio conjunto de componentes bioquímicamente distintos que incluyen, entre otros, proteínas, glucoproteínas, proteoglucanos y polisacáridos. Estos componentes de la MEC suelen ser producidos por células adyacentes y secretados a la MEC a través de la exocitosis. Una vez secretados, los componentes de la MEC suelen agregarse para formar una compleja red de macromoléculas. En diversas realizaciones, la proteína quimérica de la invención comprende un resto de transporte dirigido que reconoce un antígeno o receptor localizado en cualquier componente de la MEC. Algunos componentes ilustrativos de la MEC incluyen, entre otros, los proteoglucanos, los polisacáridos que no son proteoglucanos, las fibras y otras proteínas de la MEC o sustancias que no son proteínas de la MEC, por ejemplo, polisacáridos y/o lípidos, o moléculas asociadas a la MEC (por ejemplo, proteínas o sustancias que no son proteínas, por ejemplo, polisacáridos, ácidos nucleicos y/o lípidos).

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce un antígeno o receptor diana en proteoglucanos de la MEC. Los proteoglucanos son proteínas glucosiladas. La unidad básica del proteoglucano incluye una proteína central con una o más cadenas de glucosaminoglucanos (GAG) unidas covalentemente. Los proteoglucanos tienen una carga neta negativa que atrae iones sodio (Na^+) cargados positivamente, los cuales atraen moléculas de agua por ósmosis, manteniendo hidratadas la MEC y las células residentes. Los proteoglucanos también pueden ayudar a atrapar y almacenar factores de crecimiento dentro de la MEC. Algunos proteoglucanos ilustrativos a los que pueden dirigirse las proteínas quiméricas de la invención incluyen, entre otros, el sulfato de heparán, el sulfato de condroitina y el sulfato de queratano. En una realización, el resto de transporte dirigido reconoce una diana (por ejemplo, antígeno, receptor) en polisacáridos que no son proteoglucanos, tales como el ácido hialurónico.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce un antígeno o receptor diana sobre las fibras de la MEC. Las fibras de la MEC incluyen fibras de colágeno y fibras de elastina. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce uno o más epítomos sobre colágenos o fibras de colágeno. Los colágenos son las proteínas más abundantes de la MEC. Los colágenos están presentes en la MEC en forma de proteínas fibrilares y proporcionan soporte estructural a las células residentes. En una o más realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a distintos tipos de colágenos presentes en la MEC, incluidos, entre otros, colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V, XI), colágenos FACIT (tipos IX, XII, XIV), colágenos de cadena corta (tipos VIII, X), colágenos de membrana basal (tipo IV) y/o colágeno de tipos VI, VII, o XIII. Las fibras de elastina proporcionan elasticidad a los tejidos, permitiéndoles estirarse cuando es necesario y volver después a su estado original. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce uno o más epítomos sobre elastinas o fibras de elastina.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce una o más proteínas de la MEC incluida, entre otras, una tenascina, una fibronectina, una fibrina, una laminina o un nidógeno/entactina.

En una realización, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a la tenascina. La familia de las glucoproteínas tenascina (TN) incluye al menos cuatro miembros: tenascina-C, tenascina-R, tenascina-X y tenascina W. Las estructuras primarias de las proteínas de tenascina incluyen varios motivos comunes ordenados en la misma secuencia consecutiva: repeticiones aminoterminales en heptada, repeticiones similares a las del factor de crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor", EGF), repeticiones del dominio tipo III de la fibronectina y un dominio globular carboxilo-terminal similar al fibrinógeno. Cada miembro de la proteína está asociado a variaciones típicas en número y naturaleza de las repeticiones similares a EGF y de fibronectina de tipo III. También existen variantes de isoformas, en especial con respecto a la tenascina-C. Se conocen más de 27 variantes de corte y empalme y/o isoformas de la tenascina-C. En una realización concreta, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a la tenascina-CA1. Del mismo modo, la tenascina-R también presenta diversas variantes de corte y empalme e isoformas. La tenascina-R suele existir en forma de dímeros o trímeros. La tenascina-X es el miembro más grande de la familia de las tenascinas y se sabe que existe en forma de trímeros. La tenascina-W existe en forma de trímeros. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce uno o más epítomos sobre una proteína de tenascina. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce las formas monomérica y/o dimérica y/o trimérica y/o hexamérica de una proteína de tenascina.

- En una realización, los restos de transporte dirigido reconocen y se unen a la fibronectina. Las fibronectinas son glucoproteínas que conectan las células con las fibras de colágeno de la MEC, permitiendo que las células se muevan a través de ella. Al unirse a las integrinas, las fibronectinas se despliegan para formar dímeros funcionales. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce las formas monoméricas y/o díméricas de la fibronectina. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce uno o más epítomos sobre la fibronectina. En realizaciones ilustrativas, el resto de transporte dirigido reconoce el dominio extracelular A de fibronectina (EDA) o el dominio extracelular B de fibronectina (EDB). Los niveles elevados de EDA se asocian a diversas enfermedades y trastornos, tales como la psoriasis, la artritis reumatoide, la diabetes y el cáncer. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce a la fibronectina que contiene la isoforma EDA y puede utilizarse para dirigir la proteína quimérica a las células enfermas, incluidas las células cancerosas. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce a la fibronectina que contiene la isoforma EDB. En diversas realizaciones, tales restos de transporte dirigido pueden utilizarse para dirigir la proteína quimérica a las células tumorales, incluida la neovascularización tumoral.
- En una realización, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a la fibrina. La fibrina es otra sustancia proteica que se encuentra a menudo en la red matricial de la MEC. La fibrina se forma por la acción de la proteasa trombina sobre el fibrinógeno, lo que provoca la polimerización de la fibrina. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce uno o más epítomos sobre la fibrina. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce las formas monoméricas y polimerizadas de la fibrina.
- En una realización, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a la laminina. La laminina es un componente importante de la lámina basal, que es una red proteica que sirve de base a células y órganos. Las lamininas son proteínas heterotriméricas que contienen una cadena α , una cadena β y una cadena γ . En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce uno o más epítomos sobre la laminina. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce las formas monomérica, dímica y trimérica de la laminina.
- En una realización, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a un nidógeno o entactina. Los nidógenos/entactinas son una familia de glucoproteínas sulfatadas muy conservadas. Constituyen el principal componente estructural de las membranas basales y su función es unir las redes de laminina y colágeno IV para formar membranas basales. Los miembros de esta familia son el nidógeno-1 y el nidógeno-2. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce un epítomo sobre el nidógeno-1 y/o nidógeno-2.
- En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce un epítomo presente sobre cualquiera de las dianas (por ejemplo, proteínas de la MEC) descritas en el presente documento. En una realización, el dominio de reconocimiento del antígeno reconoce uno o más epítomos lineales presentes sobre la proteína. Tal como se utiliza en el presente documento, un epítomo lineal se refiere a cualquier secuencia continua de aminoácidos presente sobre la proteína. En otra realización, el dominio de reconocimiento del antígeno reconoce uno o más epítomos conformacionales presentes sobre la proteína. Tal como se utiliza en el presente documento, un epítomo de conformación se refiere a una o más secciones de aminoácidos (que pueden ser discontinuas) que forman una superficie tridimensional con características y/o formas y/o estructuras terciarias capaces de ser reconocidas por un dominio de reconocimiento del antígeno.
- En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido puede unirse a la longitud completa y/o formas maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o cualquier otro análogo, variante o mutante natural o sintético de cualquiera de las dianas (por ejemplo, proteínas de la MEC) descritas en el presente documento. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido puede unirse a cualquier forma de las proteínas descritas en el presente documento, incluidas las formas monoméricas, díméricas, triméricas, tetraméricas, heterodíméricas, multiméricas y asociadas. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido puede unirse a cualquier forma modificada postraduccionalmente de las proteínas descritas en el presente documento, tales como las formas glucosiladas y/o fosforiladas.
- En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce moléculas extracelulares, tales como el ADN. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce el ADN. En una realización, el ADN es vertido al espacio extracelular desde células tumorales necróticas o apoptóticas u otras células enfermas.
- En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce una o más estructuras no celulares asociadas con las placas ateroscleróticas. Se conocen dos tipos de placas ateroscleróticas. La placa fibrolipídica (fibrograsa) se caracteriza por una acumulación de células cargadas de lípidos bajo la íntima de las arterias. Debajo del endotelio hay una cubierta fibrosa que recubre el núcleo ateromatoso de la placa. El núcleo incluye células cargadas de lípidos (macrófagos y células del muscular liso) con un elevado contenido de colesterol tisular y ésteres de colesterol, fibrina, proteoglicanos, colágeno, elastina y restos celulares. En las placas avanzadas, el núcleo central de la placa suele contener depósitos de colesterol extracelular (liberado por las células muertas), que forman zonas de cristales de colesterol con hendiduras vacías en forma de aguja. En la periferia de la placa hay células espumosas más jóvenes y capilares. Una placa fibrosa también se ubica bajo la íntima, dentro de la pared de la arteria, lo que provoca un engrosamiento y expansión de la pared y, en ocasiones, un estrechamiento localizado en manchas del lumen con cierta atrofia de la capa muscular. La placa fibrosa contiene fibras de colágeno (eosinófilas), precipitados de calcio (hematoxilínófilos) y células cargadas de lípidos. En algunas

realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a uno o más de los componentes no celulares de estas placas, tales como la fibrina, los proteoglicanos, el colágeno, la elastina, los restos celulares y el calcio u otros depósitos o precipitados minerales. En algunas realizaciones, el resto celular es un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, liberado de células muertas.

- 5 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce una o más estructuras no celulares que se encuentran en las placas cerebrales asociadas con enfermedades neurodegenerativas. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a una o más estructuras no celulares localizadas en las placas amiloides que se encuentran en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, el resto de transporte dirigido puede reconocer y unirse al péptido beta
- 10 amiloide, que es un componente principal de las placas amiloides. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a una o más estructuras no celulares localizadas en las placas cerebrales de los pacientes con enfermedad de Huntington. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido reconoce y se une a una o más estructuras no celulares que se encuentran en las placas asociadas con otras enfermedades neurodegenerativas o musculoesqueléticas, tales como la demencia con cuerpos de Lewy y la miositis con cuerpos de inclusión.
- 15 En algunas realizaciones, las proteínas quiméricas de la invención pueden tener dos o más restos de transporte dirigido que se unen a estructuras no celulares. En algunas realizaciones, hay dos restos de transporte dirigido y uno se dirige a una célula mientras que el otro se dirige a una estructura no celular. En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido pueden reclutar células directa o indirectamente, tales como células enfermas y/o células efectoras. En diversas realizaciones, el agente de señalización puede modular una o más células a las que se dirigen
- 20 los restos de transporte dirigido (por ejemplo, células reclutadas, tales como células enfermas y/o células efectoras). Por ejemplo, el agente de señalización puede modular una o ambas células diana (y las células diana pueden ser efectoras y/o células enfermas), en función de si las células diana expresan un receptor para el agente de señalización.

- En algunas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas son capaces de cambiar el equilibrio de las células inmunitarias a favor del ataque inmunitario de un tumor, o pueden usarse en procedimientos que implican este cambio.
- 25 Por ejemplo, las presentes proteínas quiméricas pueden modificar la proporción de células inmunitarias en un lugar de importancia clínica a favor de las células que pueden destruir y/o suprimir un tumor (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), macrófagos antitumorales (por ejemplo, macrófagos M1), linfocitos B, células dendríticas, o subconjuntos de éstas) y en oposición a células que protegen los tumores (por ejemplo, células supresoras derivadas de mieloides ("myeloid-derived suppressor cells", MDSC), linfocitos T reguladoras (Treg); neutrófilos asociados a tumores ("tumor associated neutrophils", TAN), macrófagos M2, macrófagos asociados a tumores ("tumor associated macrophages", TAM), o subconjuntos de éstos). En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica es capaz de aumentar la proporción entre linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores.
- 30

- Por ejemplo, en algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con linfocitos T. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que recluta directa o indirectamente linfocitos T. En una realización, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a linfocitos T efectores. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que recluta directa o indirectamente
- 35 linfocitos T efectores, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico). Los linfocitos T efectores ilustrativos incluyen linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD8+, CD45RO+); linfocitos T efectores CD4+ (por ejemplo, $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD4+, CCR7+, CD62Lhi, IL-7R/CD127+); linfocitos T efectores CD8+ (por ejemplo, $\alpha\beta$ TCR, CD3^{ej}, $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD8+, CCR7+, CD62Lhi, IL7R/CD127+); linfocitos T efectores de memoria (por ejemplo, CD62Llow, CD44+, TCR, CD3+, IL-7R/CD127+, IL-15R+, CCR7low); linfocitos T de memoria central (por ejemplo, CCR7+, CD62L+, CD27+; o CCR7hi, CD44+, CD62Lhi, TCR, CD3+, IL-7R/CD127+, IL-15R+); linfocitos T efectores CD62L+; linfocitos T de memoria efectores CD8+ (TEM), incluidos linfocitos T de memoria efectores tempranos (CD27+ CD62L-) y linfocitos T de memoria efectores tardíos (CD27- CD62L-) (TemE y TemL, respectivamente); linfocitos T efectores CD127(+)CD25(bajo/-); linfocitos T efectores CD127()CD25(); células efectoras de memoria de células madre CD8+ (TSCM) (por ejemplo, CD44(bajo)CD62L(alto)CD122(alto)sca(+)); linfocitos T efectores TH1 (por ejemplo, CXCR3+, CXCR6+ y CCR5+; o $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD4+, IL-12R+, IFN γ R+, CXCR3+), linfocitos T efectores TH2 (por ejemplo, CCR3+, CCR4+ y CCR8+; o $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD4+, IL-4R+, IL-33R+, CCR4+, IL-17RB+, CRTH2+); linfocitos T efectores TH9 (por ejemplo, $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD4+); linfocitos T efectores TH17 (por ejemplo, $\alpha\beta$ TCR, CD3+, CD4+, IL-23R+, CCR6+, IL-1R+); linfocitos T efectores CD4+CD45RO+CCR7+, linfocitos T efectores ICOS+; linfocitos T efectores CD4+CD45RO+CCR7(-); y linfocitos T efectores secretores de IL-2, IL-4 y/o IFN- γ .
- 40
- 45
- 50
- 55

- Los antígenos de linfocitos T ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo (e incluidos los dominios extracelulares, cuando proceda): CD8, CD3, SLAMF4, IL-2Ra, 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R β , ALCAM, B7-1, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMF8, CEACAM1, IL-6 R, CCR3, IL-7 Ra, CCR4, CXCR1/IL-S RA, CCR5, CCR6, IL-10R a, CCR 7, IL-10 R β , CCR8, IL-12 R β 1, CCR9, IL-12 R β 2, CD2, IL-13 R a 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CDS5j, ILT3/CDS5k, ILT4/CDS5d, ILT5/CDS5a, lutegrina a 4/CD49d, CDS, integrina a E/CD103, CD6, integrina a M/CD 11 b, CDS, integrina a X/CD11c, integrina β 2/CD18, KIR/CD15S, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD2S, KIR2DL3, CD30/TNFRSF8, KIR2DL4/CD15Sd,
- 60

- CD31/PECAM-1, KIR2DS4, ligando CD40/TNFSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CDS3, leucotrieno B4-R1, CDS4/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, cadena γ común/IL-2 R γ , osteopontina, CRACC/SLAMF7, SLAMF7 (CS1), PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-selectina, CXCR3, SIRP β 1, CXCR4, SLAM, CXCR6, TCCR/WSX-1, DNAM-1, timopoyetina, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, ligando Fas/TNFSF6, TIM-4, Fc γ RIII/CD16, TIM-6, TNFR1/TNFRSF1A, granulicina, TNF RIII/TNFRSF1B, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAILR3/TNFRSF10C, IFN- γ R1, TRAILR4/TNFRSF10D, IFN- γ R2, TSLP, IL-1 R1 y TSLP R. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos de linfocitos T ilustrativos.
- En una realización ilustrativa, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 es un agente basado en proteínas capaz de unirse específicamente a CD8 sin modulación funcional (por ejemplo, neutralización parcial o completa) de CD8. CD8 es una glucoproteína transmembrana heterodimérica de tipo I, cuyas cadenas α y β están compuestas por un dominio extracelular similar a una inmunoglobulina (Ig) conectado por un pedúnculo O-glucosilado extendido a un dominio transmembrana de paso único y una cola citoplasmática corta (Li *et al.*, 2013). La región citoplasmática de la cadena α contiene dos motivos de cisteína que actúan como sitio de acoplamiento para la tirosina cinasa src p56lck (Lck). En cambio, este dominio de unión a Lck parece estar ausente de la cadena β , lo que sugiere que la cadena β de CD8 no participa en la señalización descendente (Artyomov *et al.*, 2010). CD8 actúan como coreceptor para el receptor de linfocitos T, siendo su papel principal el reclutamiento de Lck al complejo de TCR-pMHC tras la unión del coreceptor al MHC (Turner *et al.*, 1990; Veillette *et al.*, 1988). El aumento de la concentración local de esta cinasa activa una cascada de señalización que recluta y activa la proteína cinasa 70 asociada a la cadena ζ (ZAP-70), lo que posteriormente conduce a la amplificación o potenciación de las señales de activación de linfocitos T (Purbhoo *et al.*, 2001; Laugel *et al.*, 2007a).
- En diversas realizaciones, la proteína quimérica de la invención comprende un resto de transporte dirigido que tiene un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce un epítipo presente sobre las cadenas α y/o β de CD8. En una realización, el dominio de reconocimiento del antígeno reconoce uno o más epítopos lineales sobre las cadenas α y/o β de CD8. Tal como se utiliza en el presente documento, un epítipo lineal se refiere a cualquier secuencia continua de aminoácidos presentes sobre las cadenas α y/o β de CD8. En otra realización, el dominio de reconocimiento del antígeno reconoce uno o más epítopos conformacionales presentes sobre las cadenas α y/o β de CD8. Tal como se utiliza en el presente documento, un epítipo de conformación se refiere a una o más secciones de aminoácidos (que pueden ser discontinuas) que forman una superficie tridimensional con características y/o formas y/o estructuras terciarias capaces de ser reconocidas por un dominio de reconocimiento del antígeno.
- En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica puede comprender un resto de transporte dirigido que puede unirse a la longitud completa y/o formas maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o cualquier otro análogo, variante o mutante natural o sintético de las cadenas α y/o β humanas de CD8 humano. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 puede unirse a cualquier forma de las cadenas α y/o β de CD8 humano, incluidas las formas monoméricas, dimericas, heterodimericas, multiméricas y asociadas. En una realización, el resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 puede unirse a la forma monomérica de la cadena α de CD8 o a la cadena β de CD8. En otra realización, el resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 puede unirse a una forma homodimérica compuesta por dos cadenas α de CD8 o dos cadenas β de CD8. En otra realización, el resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 puede unirse a una forma heterodimérica compuesta por una cadena α de CD8 y una cadena β de CD8.
- En una realización, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido con un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce uno o más epítopos presentes sobre la cadena α de CD8 humano. En una realización, la cadena α de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 1 (SEQ ID NO: 1)

```
MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPT
SGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLT
LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY
CNHRNRRRVCKCRPVVKSGDKPSLSARYV.
```

En una realización, la cadena α de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 2 (SEQ ID NO: 2)

MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPT
SGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLT
LSDFRRENEGYFCSALNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAGNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV.

En una realización, la cadena α de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 3 (SEQ ID NO: 3)

MRNQAPGRPKGATFPPRRPTGSRAPPLAPELRAKQRPGERVMALPVTALL
LPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ
PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENE
GYYFCSALNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE

ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR

5 VCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido con un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce uno o más epítopos presentes sobre la cadena β de CD8 humano. En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 1 (SEQ ID NO: 4)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRRARLRFMKQ
FYK.

10

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 2 (SEQ ID NO: 5)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRRARLRFMKQ
LRLHPLEKCSRMDY.

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

15 Isoforma 3 (SEQ ID NO: 6)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQGRRRRRARLRFMKQPQGEISGTFVPQCLHGYYSNTTTSQKL
LNPWILKT.

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 4 (SEQ ID NO: 7)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQ
KFNIVCLKISGFTTCCCFQILQISREYGFVLLQKDIGQ.

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 5 (SEQ ID NO: 8)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQ
PQGEIGSGTFVPQCLHGYYSNTTTSQKLLNPWILKT.

5

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 6 (SEQ ID NO: 9)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKGRRRRARLRFMKQFYK.

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

10 Isoforma 7 (SEQ ID NO: 10)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKDFTNKQRIGFWCPATKRHRSSVMSTMWKNERRDTFNPGEFN
GC.

En una realización, la cadena β de CD8 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

Isoforma 8 (SEQ ID NO: 11)

MRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMR
IYWLQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNL
TSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVC
RLPRPETQKGLKGKVVQEPLSPNACMDTTAILQPHRSCLTHGS.

- 15 En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 que es un anticuerpo de dominio único, tal como un VHH. El VHH puede derivarse, por ejemplo, de un organismo que produzca anticuerpos VHH, tal como un camélido, un tiburón, o el VHH puede ser un VHH diseñado. Los VHH son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales distintivas de los anticuerpos de cadena pesada naturales. La tecnología VHH se basa en anticuerpos
- 20 totalmente funcionales de camélidos que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen

un único dominio variable (V_{HH}) y dos dominios constantes (CH_2 y CH_3). Los VHH se comercializan con la marca NANOBODY o NANOBODIES. En una realización, la presente proteína quimérica comprende un VHH.

5 En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 que es un VHH que comprende una única cadena de aminoácidos con cuatro "regiones marco" o FR ("framework regions") y tres "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR ("complementary determining regions"). Tal como se utiliza en el presente documento, "región marco" o "FR" se refiere a una región en el dominio variable que se encuentra entre las CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a las regiones variables en los VHH que contienen las secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente a las dianas antigénicas.

10 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 comprende un VHH que tiene un dominio variable que comprende al menos una secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3.

En algunas realizaciones, la secuencia de CDR1 se selecciona entre:

GFTFDDYAMS (SEQ ID NO:12) o

GFTFDDYAIG (SEQ ID NO:13).

15 En algunas realizaciones, la secuencia de CDR2 se selecciona entre:

TINWNGGSAEYAEPVKG (SEQ ID NO:14) o

CIRVSDGSTYYADPVKG (SEQ ID NO:15).

En algunas realizaciones, la secuencia de CDR3 se selecciona entre:

KDADLVWYNLS (SEQ ID NO:16) o

20 KDADLVWYNLR (SEQ ID NO:17) o

AGSLYTCVQSIVWPAPYPYDMDY (SEQ ID NO:18).

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:16.

25 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:17.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:18.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.

30 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:18.

35 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:16.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:17.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:18.

40 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17.

45 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:18.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias:

R3HCD27 (SEQ ID NO:19)

QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWV
STINWNGGSAEYAEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKLEDTAVYYCAK
DADLVWYNLSTGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGS

5 o

R3HCD129 (SEQ ID NO:20)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWV
STINWNGGSAEYAEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKLEDTAVYYCAK
DADLVWYNLRTGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGS

o

R2HCD26 (SEQ ID NO:21)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVS
CIRVSDGSTYYADPVKGRFTISSDNKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCAAGS

10 LYTCVQSIVVVPARPYDMDYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGS.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2014/0271462. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la tabla 0.1, tabla 0.2, tabla 0.3 y/o figuras 1A-12I de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2014/0271462. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD8 comprende una HCDR1 de una HCDR1 de SEQ ID NO: 22 o 23 y/o una HCDR2 de HCDR1 de SEQ ID NO: 22 o 23 y/o una HCDR3 de HCDR1 de SEQ ID NO: 22 o 23 y/o una LCDR1 de LCDR1 de SEQ ID NO: 24 y/o una LCDR2 de LCDR1 de SEQ ID NO: 24 y/o una LCDR3 de LCDR1 de SEQ ID NO: 24, como se indica a continuación.

SEQ ID NO: 22:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn
Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Ser.

20 SEQ ID NO: 23:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys
Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn
Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Ser.

SEQ ID NO: 24:

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn
 Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys.

En diversas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del resto de transporte dirigido que se dirige a CD8 incluye además un análogo de aminoácido, un derivado de aminoácido u otros aminoácidos no clásicos.

- 5 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que se dirige a CD8 que es al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 61 %, al menos aproximadamente un 62 %, al menos aproximadamente un 63 %, al menos aproximadamente un 64 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 66 %, al menos aproximadamente un 67 %, al menos aproximadamente un 68 %, al menos aproximadamente un 69 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 71 %, al menos aproximadamente un 72 %, al menos aproximadamente un 73 %, al menos aproximadamente un 74 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 76 %, al menos aproximadamente un 77 %, al menos aproximadamente un 78 %, al menos aproximadamente un 79 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento (por ejemplo, tiene aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 61 %, o aproximadamente un 62 %, o aproximadamente un 63 %, o aproximadamente un 64 %, o aproximadamente un 65 %, o aproximadamente un 66 %, o aproximadamente un 67 %, o aproximadamente un 68 %, o aproximadamente un 69 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 71 %, o aproximadamente un 72 %, o aproximadamente un 73 %, o aproximadamente un 74 %, o aproximadamente un 75 %, o aproximadamente un 76 %, o aproximadamente un 77 %, o aproximadamente un 78 %, o aproximadamente un 79 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 81 %, o aproximadamente un 82 %, o aproximadamente un 83 %, o aproximadamente un 84 %, o aproximadamente un 85 %, o aproximadamente un 86 %, o aproximadamente un 87 %, o aproximadamente un 88 %, o aproximadamente un 89 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento).

- 35 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de la invención comprende una o más mutaciones que no reducen sustancialmente la capacidad del presente resto de transporte dirigido de CD8 para unirse específicamente a CD8. En diversas realizaciones, las mutaciones no reducen sustancialmente la capacidad del resto de transporte dirigido para unirse específicamente a CD8 sin modular funcionalmente a CD8.

- 40 En diversas realizaciones, la afinidad de unión del resto de transporte dirigido de CD8 por las formas de longitud completa y/o maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o cualesquiera otros análogos, variantes o mutantes naturales o sintéticos (incluidas las formas monoméricas, diméricas, heterodiméricas, multiméricas y/o asociadas) de las cadenas α y/o β de CD8 humano puede describirse mediante la constante de disociación en equilibrio (K_D). En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se une a la longitud completa y/o formas maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o cualesquiera otros análogos, variantes o mutantes naturales o sintéticos (incluidas las formas monoméricas, diméricas, heterodiméricas, multiméricas y/o asociadas) de las cadenas α y/o β de CD8 humano con una K_D inferior a aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 400 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 5 nM, o aproximadamente 1 nM.

- 50 En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se une, pero no modula funcionalmente, al antígeno de interés, es decir, CD8. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido simplemente se dirige al antígeno, pero no modula funcionalmente de forma sustancial al antígeno, es decir, no inhibe, reduce ni neutraliza de forma sustancial un efecto biológico que tenga el antígeno. En diversas

realizaciones, el agente del resto de transporte dirigido se une a un epítipo que está físicamente separado de un sitio del antígeno que es importante para su actividad biológica (por ejemplo, el sitio activo de un antígeno).

Dicha unión que no modula funcionalmente (por ejemplo, no neutraliza) puede usarse en diversas realizaciones de la presente invención, incluidos procedimientos en los que la presente proteína quimérica se utiliza para reclutar directa o indirectamente células inmunitarias activas a un sitio en que son necesarias a través de un antígeno efector. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica puede usarse para reclutar directa o indirectamente linfocitos T citotóxicos a través de CD8 a una célula tumoral en un procedimiento de reducción o eliminación de un tumor (por ejemplo, la proteína quimérica puede comprender un resto de transporte dirigido que tenga un dominio de reconocimiento del antígeno anti-CD8 y un resto de transporte dirigido que tenga un dominio de reconocimiento (por ejemplo, un dominio de reconocimiento del antígeno) dirigido contra un antígeno o receptor tumoral). En tales realizaciones, es deseable reclutar directa o indirectamente linfocitos T citotóxicos que expresen CD8, pero no neutralizar la actividad CD8. En estas realizaciones, la señalización de CD8 es una pieza importante del efecto reductor o eliminador del tumor.

A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra un marcador de punto de control expresado en un linfocito T, por ejemplo, uno o más de PD-1, CD28, CTLA4, ICOS, BTLA, KIR, LAG3, CD137, OX40, CD27, CD40L, TIM3 y A2aR.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con linfocitos B. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento reclutan directa o indirectamente linfocitos B, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico). Algunos antígenos de linfocitos B ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD70, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138, CDw150 y antígeno de maduración de linfocitos B ("B-cell maturation antigen", BCMA). En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos de linfocitos B ilustrativos.

A modo de ejemplo adicional, en algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con linfocitos citolíticos naturales. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento reclutan directa o indirectamente linfocitos citolíticos naturales, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico). Entre los antígenos de linfocitos citolíticos naturales ilustrativos de interés se incluyen, por ejemplo, TIGIT, 2B4/SLAMF4, KIR2DS4, CD155/PVR, KIR3DL1, CD94, LMIR1/CD300A, CD69, LMIR2/CD300c, CRACC/SLAMF7, LMIR3/CD300LF, Kir1alfa, DNAM-1, LMIR5/CD300LB, Fc- ϵ -ilic RII, LMIR6/CD300LE, Fc- γ RI/CD64, MICA, Fc- γ RIIb/CD32b, MICB, Fc- γ RIIC/CD32c, MULT-1, Fc- γ RIIA/CD32a, nectina-2/CD112, Fc- γ RIII/CD16, NKG2A, FcRH1/IRTA5, NKG2C, FcRH2/IRTA4, NKG2D, FcRH4/IRTA1, NKp30, FcRH5/IRTA2, NKp44, similar al receptor de Fc γ 3/CD16-2, NKp46/NCR1, NKp80/KLRF1, NTB-A/SLAMF6, Rae-1, Rae-1 α , Rae-1 β , Rae-1 delta, H60, Rae-1 ϵ , ILT2/CD85j, Rae-1 γ , ILT3/CD85k, TREM-1, ILT4/CD85d, TREM-2, ILT5/CD85a, TREM-3, KIR/CD158, TREML1/TLT-1, KIR2DL1, ULBP-1, KIR2DL3, ULBP-2, KIR2DL4/CD158d y ULBP-3. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos ilustrativos de linfocitos NK.

Además, en algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con macrófagos/monocitos. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento reclutan directa o indirectamente macrófagos/monocitos, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico). Entre los antígenos de macrófagos/monocitos ilustrativos de interés se incluyen, por ejemplo, SIRP1a, B7-1/CD80, ILT4/CD85d, B7-H1, ILT5/CD85a, cadena β común, integrina α 4/CD49d, BLAME/SLAMF8, integrina α X/CD11c, CCL6/C10, integrina β 2/CD18, CD155/PVR, integrina β 3/CD61, CD31/PECAM-1, latexina, CD36/SR-B3, leucotrieno B4 R1, CD40/TNFRSF5, LIMP11SR-B2, CD43, LMIR1/CD300A, CD45, LMIR2/CD300c, CD68, LMIR3/CD300LF, CD84/SLAMF5, LMIR5/CD300LB, CD97, LMIR6/CD300LE, CD163, LRP-1, CD2F-10/SLAMF9, MARCO, CRACC/SLAMF7, MD-1, ECF-L, MD-2, EMMPRIN/CD147, MGL2, endoglina/CD105, osteoactivina/GPNMB, Fc- γ RI/CD64, osteopontina, Fc- γ RIIb/CD32b, PD-L2, Fc- γ RIIC/CD32c, Siglec-3/CD33, Fc- γ RIIA/CD32a, SIGNR1/CD209, Fc- γ RIII/CD16, SLAM, GM-CSF R α , TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TLR3, IFN- γ RI, TLR4, IFN γ R2, TREM-1, IL-1 RII, TREM-2, ILT2/CD85j, TREM-3, ILT3/CD85k, TREML1/TLT-1, 2B4/SLAMF4, IL-10 R α , ALCAM, IL-10 R β , aminopeptidasaN/ANPEP, ILT2/CD85j, cadena β común, ILT3/CD85k, C1q R1/CD93, ILT4/CD85d, CCR1, ILT5/CD85a, CCR2, integrina α 4/CD49d, CCR5, integrina α M/CD11b, CCR8, integrina α X/CD11c, CD155/PVR, integrina β 2/CD18, CD14, integrina β 3/CD61, CD36/SR-B3, LAIR1, CD43, LAIR2, CD45, leucotrieno B4-R1, CD68, LIMP11SR-B2, CD84/SLAMF5, LMIR1/CD300A, CD97, LMIR2/CD300c, CD163, LMIR3/CD300LF, factor de coagulación III/factor tisular, LMIR5/CD300LB, CX3CR1, CX3CL1, LMIR6/CD300LE, CXCR4, LRP-1, CXCR6, M-CSF R, DEP-1/CD148, MD-1, DNAM-1, MD-2, EMMPRIN/CD147, MMR, endoglina/CD105, NCAM-L1, Fc- γ RI/CD64, PSGL-1, Fc- γ RIIICD16, RP105, G-CSF R, L-selectina, GM-CSF R α , Siglec-3/CD33, HVEM/TNFRSF14, SLAM, ICAM-1/CD54, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102,

TREM-1, IL-6 R, TREM-2, CXCR1/IL-8 RA, TREM-3 y TREM1/TLT-1. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos ilustrativos de macrófagos/monocitos.

Además, en algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con células dendríticas. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento reclutan directa o indirectamente células dendríticas, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico). Algunos antígenos de células dendríticas ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, CLEC9A, XCR1, RANK, CD36/SRB3, LOX-1/SR-E1, CD68, MARCO, CD163, SR-A1/MSR, CD5L, SREC-1, CL-PI/COLEC12, SREC-II, LIMP1/ISRB2, RP105, TLR4, TLR1, TLR5, TLR2, TLR6, TLR3, TLR9, ligando 4-IBB/TNFSF9, IL-12/IL-23 p40, 4-amino-1,8-naftalimida, ILT2/CD85j, CCL21/6Ccina, ILT3/CD85k, 8-oxo-dG, ILT4/CD85d, 8D6A, ILT5/CD85a, A2B5, lutegrina α 4/CD49d, A α g, integrina β 2/CD18, AMICA, langerina, B7-2/CD86, leucotrieno B4 RI, B7-H3, LMIR1/CD300A, BLAME/SLAMF8, LMIR2/CD300c, Clq R1/CD93, LMIR3/CD300LF, CCR6, LMIR5/CD300LB CCR7, LMIR6/CD300LE, CD40/TNFRSF5, MAG/Siglec-4-a, CD43, MCAM, CD45, MD-1, CD68, MD-2, CD83, MDL-1/CLEC5A, CD84/SLAMF5, MMR, CD97, NCAM1, CD2F-10/SLAMF9, osteoactivina GPNMB, Chern 23, PD-L2, CLEC-1, RP105, CLEC-2, CLEC-8, Siglec-2/CD22, CRACC/SLAMF7, Siglec-3/CD33, DC-SIGN, Siglec-5, DC-SIGNR/CD299, Siglec-6, DCAR, Siglec-7, DCIR/CLEC4A, Siglec-9, DEC-205, Siglec-10, dectina-1/CLEC7A, Siglec-F, dectina-2/CLEC6A, SIGNR1/CD209, DEP-1/CD148, SIGNR4, DLEC, SLAM, EMMPRIN/CD147, TCCR/WSX-1, Fc- γ R1/CD64, TLR3, Fc- γ RIIB/CD32b, TREM-1, Fc- γ RIIC/CD32c, TREM-2, Fc- γ RIIA/CD32a, TREM-3, Fc- γ RIIC/CD16, TREM1/TLT-1, ICAM-2/CD102, DEC205 y vainilloide R1. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos ilustrativos de CD.

En una realización ilustrativa, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se dirige contra Clec9A. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido que se dirige contra Clec9A es un agente basado en proteínas capaz de unirse específicamente a Clec9A. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido es un agente basado en proteínas capaz de unirse específicamente a Clec9A sin neutralizar Clec9A. Clec9A es un receptor de tipo lectina C ("C-type lectin-like receptor", CTLR) del grupo V que se expresa en la superficie de un subconjunto de células dendríticas (es decir, células dendríticas BDCA₃+) especializadas en la captación y procesamiento de materiales procedentes de células muertas. Clec9A reconoce un componente conservado dentro de las células nucleadas y no nucleadas, expuesto cuando se dañan las membranas celulares. CLEC9A se expresa en la superficie celular en forma de un dímero glucosilado y puede mediar en la endocitosis, pero no en la fagocitosis. CLEC9A posee un motivo citoplasmático similar a inmunorreceptor de activación basado en tirosina que puede reclutar a la cinasa Syk e inducir la producción de citocinas proinflamatorias (véase Huysamen *et al.* (2008), JBC, 283:16693-16701).

En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que tiene un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce un epítipo presente sobre Clec9A. En una realización, el dominio de reconocimiento del antígeno reconoce uno o más epítopos lineales presentes sobre Clec9A. Tal como se utiliza en el presente documento, un epítipo lineal se refiere a cualquier secuencia continua de aminoácidos presentes sobre Clec9A. En otra realización, el dominio de reconocimiento del antígeno reconoce uno o más epítopos conformacionales presentes sobre Clec9A. Tal como se utiliza en el presente documento, un epítipo de conformación se refiere a una o más secciones de aminoácidos (que pueden ser discontinuas) que forman una superficie tridimensional con características y/o formas y/o estructuras terciarias capaces de ser reconocidas por un dominio de reconocimiento del antígeno.

En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que puede unirse a la longitud completa y/o formas maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o cualquier otro análogo, variante o mutante natural o sintético de Clec9A humano. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido puede unirse a cualquier forma de Clec9A humano, incluidas las formas monoméricas, dimericas, heterodimericas, multiméricas y asociadas. En una realización, el resto de transporte dirigido se une a la forma monomérica de Clec9A. En otra realización, el resto de transporte dirigido se une a una forma dimerica de Clec9A. En otra realización, el resto de transporte dirigido se une a la forma glucosilada de Clec9A, que puede ser monomérica o dimerica.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido con un dominio de reconocimiento del antígeno que reconoce uno o más epítopos presentes sobre Clec9A humano. En una realización, el Clec9A humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

MHEEEIYTSLQWDSPAPDTYQKCLSSNKCSGACCLVMVISCVFCMGLLTA
SIFLGVKLLQVSTIAMQQEKLQKERALLNFTWKRSCALQMKYCQAFMQ
NSLSSAHNSSPCPNWQNRSCYVSEIWSIWHTSQENCLKEGSTLLQIE
SKEEMDFITGSLRKIKGSYDYWVGLSQDGHSGRWLWQDGSPPSPGLLPA
ERSQSANQVCGYVKSNSLLSSNCSTWKYFICEKYALRSSV (SEQ ID NO:
25).

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que es un anticuerpo de dominio único, tal como un VHH (que está disponible en el mercado con la marca NANOBODIES) como se describe en otro punto del presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica comprende un VHH.

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que es un VHH que comprende una única cadena de aminoácidos con cuatro "regiones marco" o FR y tres "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, "región marco" o "FR" se refiere a una región en el dominio variable que se encuentra entre las CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a las regiones variables en los VHH que contienen las secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente a las dianas antigénicas.

En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un VHH que tiene un dominio variable que comprende al menos una secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3.

En algunas realizaciones, la secuencia de CDR1 se selecciona entre:

GSISSINVMG (SEQ ID NO: 26);
GSFSSINVMG (SEQ ID NO: 27);
GSISSINIMG (SEQ ID NO: 28);
GSISSINIMG (SEQ ID NO: 29);
VSIFSINAMG (SEQ ID NO: 30);
GSIFSLNAMG (SEQ ID NO: 31);
GRTISNYDMA (SEQ ID NO: 32);
GRTFTTSLMQ (SEQ ID NO: 33);
ERNLRIYDMA (SEQ ID NO: 34);
ERNLRSYDMA (SEQ ID NO: 35);
GLTFSNYHMG (SEQ ID NO: 36);
GLTFSSYHMG (SEQ ID NO: 37);
GLTFSTRYHMG (SEQ ID NO: 38);
GLTLSSYYIA (SEQ ID NO: 39);
GLTFSSYYTG (SEQ ID NO: 40);
GLTLSSYHMG (SEQ ID NO: 41);
GRTSSPYVTG (SEQ ID NO: 42);
GFTFSGYVMS (SEQ ID NO: 43);
GFTFSGYVMT (SEQ ID NO: 44); o
GFTFSGYLMS (SEQ ID NO: 45).

En algunas realizaciones, la secuencia de CDR2 se selecciona entre:

RITNLGLPNYADWLKD (SEQ ID NO: 46);

RITNLGLPNYADSVTG (SEQ ID NO: 47);
 RITNIGLPNYADSVKG (SEQ ID NO: 48);
 RITNLGLPNYADSVEG (SEQ ID NO: 49);
 AITSGGRWYSDSVKG (SEQ ID NO: 50);
 5 AITSGGRTAYADSVKG (SEQ ID NO: 51);
 HITSDGRIVYADPVKG (SEQ ID NO: 52);
 RISGSGDRTDYADSVKG (SEQ ID NO: 53);
 SITWSTGNTHYADSVKG (SEQ ID NO: 54);
 VISSSGDSTHYSDVKG (SEQ ID NO: 55);
 10 VITSSGDSTHYSDVKG (SEQ ID NO: 56);
 QITWSDASIYYAGSVKG (SEQ ID NO: 57);
 QITWSDTSIYYAGSVKG (SEQ ID NO: 58);
 QITWSDGTTYYPGSVKG (SEQ ID NO: 59);
 QIRWSDDSTYYPGSVKG (SEQ ID NO: 60);
 15 QISWSDDSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 61);
 TVSWGCVTYADSVKG (SEQ ID NO: 62);
 SIGSGGGYPSYTDSEV (SEQ ID NO: 63);
 SIGSGGGYPSYTGSEV (SEQ ID NO: 64);
 HIGSGGGYPSYTDSEV (SEQ ID NO: 65);
 20 HIGSGGGHATYTDSEV (SEQ ID NO: 66); o
 TIGSGGGITSYADSVKG (SEQ ID NO: 67).

En algunas realizaciones, la secuencia de CDR3 se selecciona entre:

VALSAEY (SEQ ID NO: 68);
 VALKAEY (SEQ ID NO: 69);
 25 VGLKAEY (SEQ ID NO: 70);
 KTKSAVLFGGMDY (SEQ ID NO: 71);
 YIRGEDY (SEQ ID NO: 72);
 KHYASNY (SEQ ID NO: 73);
 QDFGSPSF (SEQ ID NO: 74);
 30 QDFRSPDF (SEQ ID NO: 75);
 QIFGSPNF (SEQ ID NO: 76);
 LAIHGDY (SEQ ID NO: 77);
 NQIRQWP (SEQ ID NO: 78);
 NSIRQWP (SEQ ID NO: 79);
 35 NAIRQWP (SEQ ID NO: 80);
 RKGVGPDY (SEQ ID NO: 81);

NTFGNVY (SEQ ID NO: 82):

LGR: 0

VIK

- [illegible]

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:59 y SEQ ID NO:81. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:68.

5 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:81. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:68.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:81. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:68.

10 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:81. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:68.

15 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:62 y SEQ ID NO:82. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:68.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:63 y LGR.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:64 y LGR.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:65 y LGR.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:66 y LGR.

20 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:67 y VIK.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias:

R2CHCL8 (SEQ ID NO: 83)

QVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGSISSINVMGWYRQAPGKERELVAR
ITNLGLPNYADWLKDRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYLVALS
AEYWGQGTQVTVSS;

25 R1CHCL50 (SEQ ID NO: 84)

QVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVA
RITNLGLPNYADSVTGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCYLVALK
AEYWGQGTQVTVSS;

R1CHCL21 (SEQ ID NO: 85)

QVQLVESGGGLVHRGGSLRLSCAASGSISSINIMGWYRQAPGKERELVARI
TNIGLPNYADSVKGRFTISRDNKSTVYQLQMNSLNAEDTAVYYCYLVALKA
EYWGQGTQVTVSS;

R2CHCL87 (SEQ ID NO: 86)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISSINVMGWYRQAPGKERELVA
RITNLGLPNYADSVGRFTISRDKDENTVYLEMNTLKPEDTAVYYCYLVGLK
AEYWGQGTQVTVSS;

30

R2CHCL24 (SEQ ID NO: 87)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSDSINAMGWYRQAPGKERELVA
AITSGRVYSDSVKGRGTISRDNKNTVYQLIASLKPEDTAVYYCYNVGTK
SAVLFGGMDYWGKGTQVTVSS;

R2CHCL38 (SEQ ID NO: 88)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVSIFSINAMGWYRQAPGKERELVAA
ITSGGRTAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTDVYYCKAYIRG
EDYWGKGTQVTVSS;

R1CHCL16 (SEQ ID NO: 89)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSLNAMGWYRQAPGKERELVA
HITSDGRIVYADPVKGRFTISRVDGKNMVTLMNSLKPEDTAVYYCNAKH
ASNYWGQGTQVTVSS;

5

R2CHCL10 (SEQ ID NO: 90)

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTISNYDMAWSRQAPGKEREFVA
RISGSGDRDITYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCQIQD
FGSPSFSGQGTQVTVSS;

R1CHCL34 (SEQ ID NO: 91)

DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTISNYDMAWSRQAPGKEREFVA
RISGSGDRDITYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCQIQD
FRSPDFWSQGTQVTVSS;

R1CHCL82 (SEQ ID NO: 92)

QVQLVESGGESVQAGGSLRLSCAASGRTISNYDMAWSRQAPGKEREFVA
RISGSGDRDITYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYNCQTQI
FGSPNFSGQGTQVTVSS;

10

R2CHCL3 (SEQ ID NO: 93)

QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFTTSLMQWHRQAPGKEREFVA
SITWSTGNTHYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAIYTCRVLAI
HGDYWGQGTQVTVSS;

R2CHCL69 (SEQ ID NO: 94)

DVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASERNLRIYDMAWYRQAPGKEREYVA
VISSSGDSTHYSDFKGRFTISRDNKNTVSLQMDSLKPEDTAFYYCNVNQ
IRQWPWGQGTQVTVSS;

15

R1CHCL56 (SEQ ID NO: 95)

QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASERNLRIYDMAWYRQAPGKEREYVA
VISSSGDSTHYSDFKGRFTISRDNKNTVSLQMDSLKPEDTAFYYCNVNS
IRQWPWGQGTQVTVSS;

R2CHCL32 (SEQ ID NO: 96)

QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASERNLRSYDMAWWRQAPGKEREYV
AVITSSGDSTHYSDFKGRFTISRDNKNTVSLQMDSLKPEDTASYCYNVN
AIRQWPWGQGTQVTVSS;

R2CHCL49 (SEQ ID NO: 97)

ES 2 981 745 T3

DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAISGLTFSNYHMGWYRQAPGREREFVA
QITWSDASIYYAGSVKGRFTISRDNVKNIVYLQIDNLKPEDTAIYYCDARKVG
GPDYWGQGTQVTVSS;

R2CHCL53 (SEQ ID NO: 98)

QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAISGLTFSSYHMGWYRQAPGREREFVA
QITWSDTSIYYAGSVKGRFTISRDNVKNIVYLQIDNLKPEDTAIYYCDARKVG
GPDYWGQGTQVTVSS;

R2CHCL22 (SEQ ID NO: 99)

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAISGLTFSRYHMGWYRQAPGREREFVA
QITWSDGTTYPPGSVKGRFTISRDNARNTVYLQIDNLKPEDTAIYYCDARKV
GGPDYWGQGTQVTVSS;

5

R2CHCL25 (SEQ ID NO: 100)

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGTLSSYYIAWYRQAPGREREFVAQ
IRWSDDSTYYPGSVKGRFTISRDNARNTVYLRMDNLKPEDTARYYCDARK
VGGPDYWGQGTQVTVSS;

R2CHCL18 (SEQ ID NO: 101)

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGTLSSYYTGWYRQAPGREREFVA
QISWSDSTYYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNNLKPGDTAIYYCDARK
VGGPDYWGQGTQVTVSS;

10

R1CHCL23 (SEQ ID NO: 102)

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGTLSSYHMGWYRQAPGREREFVA
QISWSDSTYYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNNLKPEDTAIYYCDARK
VGGPDYWGQGTQVTVSS;

R1CHCL27 (SEQ ID NO: 103)

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSSPYVTGWYRQTPGKEREPVA
TVSWGCVTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNALKPEDTAIYYCNVNTF
GNVYWGQGTQVTVSS;

R2CHCL13 (SEQ ID NO: 104)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYVMSWVRQAPGKGLEWV
ASIGSGGGYPSYTDSEGRFTISRDNKNTLYLLMDNLKPDDTAVYYCEML
GRRGQGTQVTVSS;

15

R2CHCL14 (SEQ ID NO: 105)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYVMSWVRQAPGKGLEWV
ASIGSGGGYPSYTDSEGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPDDTAVYYCEM
LGRRGQGTQVTVSS;

R2CHCL42 (SEQ ID NO: 106)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYVMSWVRQAPGKGLEWV
ASISGGGYPSTGSGVEGRFTISRDNKNTLYLLMNNLKPDVTAVYYCEML
GRRGQGTQVTSS;

R2CHCL41 (SEQ ID NO: 107)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYVMSWVRQAPGKGLEWV
AHIGSGGGYPSTDSVQGRFTISRDNKNTLYLQMNLLKPEDTAVYYCEM
LGRRGQGTQVTSS;

R2CHCL94 (SEQ ID NO: 108)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYVMTWVRQAPGKGLEWV
AHIGSGGGHATYTDVSGRFTISRDNKNTLYLQMNLLKAEDTAVYYCEFL
GRRGQGTQVTSS; or

R2CHCL27 (SEQ ID NO: 109)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYLMSWVRQAPGKGLEWV
ATIGSGGGITSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLLKHEDTAVYYCETVI
KRGQGTQVTSS.

En diversas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del resto de transporte dirigido que se dirige contra Clec9A incluye además un análogo de aminoácido, un derivado de aminoácido u otros aminoácidos no clásicos.

- 10 En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 60 % idéntica a cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento. Por ejemplo, la proteína quimérica puede comprender un resto de transporte dirigido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 61 %, al menos aproximadamente un 62 %, al menos aproximadamente un 63 %, al menos aproximadamente un 64 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 66 %, al menos aproximadamente un 67 %, al menos aproximadamente un 68 %, al menos aproximadamente un 69 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 71 %, al menos aproximadamente un 72 %, al menos aproximadamente un 73 %, al menos aproximadamente un 74 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 76 %, al menos aproximadamente un 77 %, al menos aproximadamente un 78 %, al menos aproximadamente un 79 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento (por ejemplo, tiene aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 61 %, o aproximadamente un 62 %, o aproximadamente un 63 %, o aproximadamente un 64 %, o aproximadamente un 65 %, o aproximadamente un 66 %, o aproximadamente un 67 %, o aproximadamente un 68 %, o aproximadamente un 69 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 71 %, o aproximadamente un 72 %, o aproximadamente un 73 %, o aproximadamente un 74 %, o aproximadamente un 75 %, o aproximadamente un 76 %, o aproximadamente un 77 %, o aproximadamente un 78 %, o aproximadamente un 79 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 81 %, o aproximadamente un 82 %, o aproximadamente un 83 %, o aproximadamente un 84 %, o aproximadamente un 85 %, o aproximadamente un 86 %, o aproximadamente un 87 %, o aproximadamente un 88 %, o aproximadamente un 89 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento).
- 40 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de la invención comprende una o más mutaciones que no reducen sustancialmente la capacidad del resto de transporte dirigido de Clec9A para unirse específicamente a Clec9A. En diversas realizaciones, las mutaciones no reducen sustancialmente la capacidad del resto de transporte dirigido para unirse específicamente a Clec9A sin neutralizar Clec9A.

- En diversas realizaciones, la afinidad de unión del resto de transporte dirigido de Clec9A por las formas de longitud completa y/o maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o formas monoméricas y/o diméricas y/o cualquier otro análogo, variante o mutante natural o sintético (incluidas las formas monoméricas y/o diméricas) de Clec9A humano puede describirse por la constante de disociación en equilibrio (K_D). En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se une a la longitud completa y/o formas maduras y/o isoformas y/o variantes de corte y empalme y/o fragmentos y/o cualesquiera otros análogos, variantes o mutantes naturales o sintéticos (incluidas las formas monoméricas y/o diméricas) de Clec9A humano con una K_D de menos de aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 400 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 5 nM, o aproximadamente 1 nM.
- En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se une, pero no modula funcionalmente, al antígeno de interés, por ejemplo, Clec9A. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A simplemente se dirige al antígeno, pero no modula funcionalmente sustancialmente (por ejemplo, inhibe, reduce o neutraliza sustancialmente) un efecto biológico que tiene el antígeno. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de Clec9A se une a un epítipo que está físicamente separado de un sitio del antígeno que es importante para su actividad biológica (por ejemplo, el sitio activo de un antígeno).
- Tal unión sin modulación significativa de la función puede usarse en diversas realizaciones de la presente invención, incluidos procedimientos en los que la presente proteína quimérica se utiliza para reclutar directa o indirectamente células inmunitarias activas a un sitio que las necesita a través de un antígeno efector. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica puede usarse para reclutar directa o indirectamente células dendríticas a través de Clec9A a una célula tumoral en un procedimiento de reducción o eliminación de un tumor (por ejemplo, la proteína quimérica puede comprender un resto de transporte dirigido que tenga un dominio de reconocimiento del antígeno anti-Clec9A y un resto de transporte dirigido que tenga un dominio de reconocimiento (por ejemplo, dominio de reconocimiento del antígeno) dirigido contra un antígeno o receptor tumoral). En tales realizaciones, es deseable reclutar directa o indirectamente células dendríticas, pero no modular funcionalmente la actividad Clec9A. En estas realizaciones, la señalización de Clec9A es una pieza importante del efecto reductor o eliminador del tumor.
- En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica mejora la presentación de antígenos por las células dendríticas. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica puede reclutar directa o indirectamente células dendríticas a través de Clec9A a una célula tumoral, en donde los antígenos tumorales son posteriormente endocitados y presentados sobre la célula dendrítica para la inducción de potentes respuestas de linfocitos T citotóxicos y humorales.
- En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor sobre células inmunitarias seleccionadas, entre otras, de megacariocitos, trombocitos, eritrocitos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, o subconjuntos de los mismos. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento reclutan directa o indirectamente megacariocitos, trombocitos, eritrocitos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, o subconjuntos de los mismos, por ejemplo, en algunas realizaciones, a un sitio terapéutico (por ejemplo, un locus con una o más células enfermas o células que se van a modular para conseguir un efecto terapéutico).
- En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con megacariocitos y/o trombocitos. Algunos antígenos de megacariocitos y/o trombocitos ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, GP IIb/IIIa, GPIb, vWF, PF4 y TSP. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos ilustrativos de megacariocitos y/o trombocitos.
- En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con eritrocitos. Algunos antígenos de eritrocitos ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, CD34, CD36, CD38, CD41a (glucoproteína plaquetaria IIb/IIIa), CD41b (GPIIb), CD71 (receptor de transferrina), CD105, glicoforina A, glicoforina C, c-kit, HLA-DR, H2 (MHC-II) y antígenos Rhesus. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos ilustrativos de eritrocitos.
- En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con mastocitos. Algunos antígenos de mastocitos ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, SCFR/CD117, Fc ϵ RI, CD2, CD25, CD35, CD88, CD203c, C5R1, CMAI, FCER1A, FCER2, TPSAB1. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos de mastocitos.
- En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con basófilos. Algunos antígenos de basófilos

ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, Fc ϵ RI, CD203c, CD123, CD13, CD107a, CD107b y CD164. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos de basófilos.

5 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con neutrófilos. Algunos antígenos de neutrófilos ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, 7D5, CD10/CALLA, CD13, CD16 (FcRIII), proteínas CD18 (LFA-1, CR3 y p150, 95), CD45, CD67 y CD177. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos de neutrófilos.

10 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a un antígeno diana o receptor asociado con eosinófilos. Algunos antígenos de eosinófilos ilustrativos de interés incluyen, por ejemplo, CD35, CD44 y CD69. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos de eosinófilos.

15 En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido puede comprender un dominio de reconocimiento del antígeno que puede unirse a cualquier diana, antígeno, receptor o marcador de la superficie celular adecuado conocido por el experto en la materia. En algunas realizaciones, el antígeno o marcador de la superficie celular es un marcador específico de tejido. Algunos marcadores específicos de tejido ilustrativos incluyen, entre otros, marcadores de la superficie de células endoteliales, tales como ACE, CD14, CD34, CDH5, ENG, ICAM2, MCAM, NOS3, PECAM1, PROCR, SELE, SELP, TEK, THBD, VCAM1, VWF; marcadores de la superficie de células del músculo liso, tales como ACTA2, MYHIO, MYHI 1, MYH9, MYOCD; marcadores de la superficie de células fibroblásticas (estromales), tales como ALCAM, CD34, COL1A1, COL1A2, COL3A1, FAP, PH-4; marcadores de la superficie de células epiteliales, tales como CDID, K6IRS2, KRTIO, KRT13, KRT17, KRT18, KRT19, KRT4, KRT5, KRT8, MUCI, TACSTD1; marcadores de neovascularización, tales como CD13, TFNA, Alfa-v beta-3 ($\alpha v \beta_3$), E-selectina; y marcadores de la superficie de adipocitos, tales como ADIPOQ, FABP4 y RETN. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos. En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a una o más células que tienen estos antígenos.

25 En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento se unen específicamente a un antígeno diana o receptor asociado a células tumorales. En algunas realizaciones, los dominios de reconocimiento reclutan directa o indirectamente células tumorales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el reclutamiento directo o indirecto de la célula tumoral es a una o más células efectoras (por ejemplo, una célula inmunitaria como se describe en el presente documento) que pueden matar y/o suprimir la célula tumoral.

30 Las células tumorales o cancerosas se refieren a un crecimiento incontrolado de células o tejidos y/o a un aumento anómalo de la supervivencia celular y/o a la inhibición de la apoptosis que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas del organismo. Por ejemplo, las células tumorales incluyen cánceres benignos y malignos, pólipos, hiperplasias, así como tumores latentes o micrometástasis. Algunas células tumorales ilustrativas incluyen, entre otras, células de carcinoma basocelular, cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer óseo; cáncer cerebral y del sistema nervioso central; cáncer de mama; cáncer de peritoneo; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon y recto; cáncer del tejido conjuntivo; cáncer del aparato digestivo; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico (incluido el cáncer gastrointestinal); glioblastoma; carcinoma hepático; hepatoma; neoplasia intraepitelial; cáncer de riñón o renal; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; 35 cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón); melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de cavidad oral (labio, lengua, boca y faringe); cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer de recto; cáncer del aparato respiratorio; carcinoma de glándulas salivales; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de células escamosas; cáncer de estómago; cáncer de testículo; cáncer de tiroides; cáncer de útero o de endometrio; 40 cáncer del aparato urinario; cáncer de vulva; linfoma, incluido el linfoma de Hodgkin y el linfoma no hodgkiniano, así como el linfoma de linfocitos B (incluido el linfoma no hodgkiniano (LNH) de grado bajo/folicular; linfoma no hodgkiniano (LNH) linfocítico pequeño (LS); linfoma no hodgkiniano de grado intermedio/folicular; linfoma no hodgkiniano de grado intermedio difuso; linfoma no hodgkiniano inmunoblástico de grado alto; linfoma no hodgkiniano linfoblástico de grado alto; linfoma no hodgkiniano de células pequeñas no hendidas de grado alto; linfoma no hodgkiniano de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el sida; y macroglobulinemia de Waldenstrom; 45 leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; así como otros carcinomas y sarcomas; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada a facomatosis, edema (por ejemplo, la asociada a tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

55 Las células tumorales, o células cancerosas también incluyen, entre otras, carcinomas, por ejemplo, diversos subtipos, incluidos, por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transicionales), sarcomas (incluidos, por ejemplo, de hueso y tejido blando), leucemias (incluidas, por ejemplo, mieloide aguda, linfoblástica aguda, mieloide crónica, linfocítica crónica y de células pilosas), linfomas y mielomas (por ejemplo, linfomas de Hodgkin y no hodgkinianos, de cadena ligera, no secretores, MGUS y plasmocitomas), y cánceres del sistema nervioso central (por ejemplo, cerebrales (por ejemplo, gliomas (por ejemplo,

astrocitoma, oligodendroglioma y ependimoma), meningioma, adenoma hipofisario y neuromas, y tumores de la médula espinal (por ejemplo, meningiomas y neurofibroma).

Algunos antígenos tumorales ilustrativos incluyen, entre otros, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de próstata ("Prostate Specific Antigen", PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de próstata ("prostate-specific membrane antigen", PSMA), receptor de linfocitos T/cadena zeta-CD3, antígenos tumorales de la familia MAGE (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), antígenos tumorales de la familia GAGE (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-caderina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de la poliposis adenomatosa coli ("adenomatous polyposis coli", APC), fodrina, conexina 37, idiotipo de Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos víricos, tales como proteínas del virus del papiloma humano, antígenos tumorales de la familia Smad, Imp-1, NA, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 CT-7, c-erbB-2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD56, CD70, CD74, CD138, AGS16, MUC1, GPNMB, Ep-CAM, PD-L1, PD-L2, PMSA y BCMA (TNFRSF17). En diversas realizaciones, un resto de transporte dirigido de la proteína quimérica se une a uno o más de estos antígenos tumorales.

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) uno o más de los restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula inmunitaria seleccionada entre un linfocito T, un linfocito B, una célula dendrítica, un macrófago, un linfocito NK o subconjuntos de las mismas y (ii) uno o más de los restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T (incluido, entre otros, un linfocito T efector) y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito B y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un macrófago y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito NK y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD8, SLAMF4, IL-2 R α , 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R β , ALCAM, B7-1, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMF5, CEACAM1, IL-6 R, CCR3, IL-7 R α , CCR4, CXCR1/IL-8 R α , CCR5, CCR6, IL-10 R α , CCR 7, IL-10 R β , CCR8, IL-12 R β 1, CCR9, IL-12 R β 2, CD2, IL-13 R α 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CDS5j, ILT3/CDS5k, ILT4/CDS5d, ILT5/CDS5a, integrina α 4/CD49d, CDS, integrina α E/CD103, CD6, integrina α M/CD 11 b, CDS, integrina α X/CD11c, integrina β 2/CD15, KIR/CD15S, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD23, KIR2DL3, CD30/TNFRSF5, KIR2DL4/CD15Sd, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, ligando CD40/TNFRSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CDS3, leucotrieno B4-R1, CDS4/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, cadena γ común/IL-2 R γ , osteopontina, CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-selectina, CXCR3, SIRP β 1, CXCR4, SLAM, CXCR6, TCCR/WSX-1, DNAM-1, timopoyetina, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, ligando Fas/TNFRSF6, TIM-4, Fc γ RIII/CD16, TIM-6, TNFR1/TNFRSF1A, granulinsina, TNF RIII/TNFRSF1B, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAILR3/TNFRSF10C, IFN- γ R1, TRAILR4/TNFRSF10D, IFN- γ R2, TSLP, IL-1 R1, o TSLP R; y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra (i) un marcador de punto de control expresado sobre un linfocito T, por ejemplo, uno o más de PD-1, CD28, CTLA4, ICOS, BTLA, KIR, LAG3, CD137, OX40, CD27, CD40L, TIM3, y A2aR y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra PD-1. En algunas realizaciones, la proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se unen selectivamente a un polipéptido de PD-1. En algunas realizaciones, la proteína quimérica comprende uno o más

anticuerpos, derivados o formatos de anticuerpos, péptidos o polipéptidos, o proteínas de fusión que se unen selectivamente a un polipéptido de PD-1.

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab (también conocido como MK-3475, KEYTRUDA), o fragmentos del mismo. El pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD-1 humanizados se describen en Hamid, *et al.* (2013), New England Journal of Medicine, 369 (2): 134-144, documentos US 8 354 509 y WO 2009/114335. En realizaciones ilustrativas, el pembrolizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNF
NEKEFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT'TVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 110) ;

- 10 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL
SLTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 111).

- 15 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-1 nivolumab (también conocido como BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, OPDIVO), o fragmentos del mismo. El nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1 se describen en los documentos US 8 008 449 y WO 2006/121168. En realizaciones ilustrativas, el nivolumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVESGGG VVQPGRSRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGT'LVTVSSASTKGPS
VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS
VVTVPSSSLG TKYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVSVLT
VLHQLDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 112);

y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPA
RFGSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQ SSNWPRFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYSLSSLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFN R GEC (SEQ ID NO: 113).

- 20 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-1 pidilizumab (también conocido como CT-011, hBAT o hBAT-1), o fragmentos del mismo. El pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humanizados se divulgan en los documentos US 2008/0025980 y WO 2009/101611. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15-18 del documento US 2008/0025980:

SEQ ID NO: 15 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 114):

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSYMHWFQKPGKAPKLLIYRTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQRRSFPLTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 16 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 115):

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDYTLTINSLQPEDFATYYCQRRSFPLTFGGGTKLEIK;

- 30 SEQ ID NO: 17 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 116):

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSVMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDYCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 18 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 117):

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSVMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR
FSGSGSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK;

5 y/o una cadena pesada que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 20-24 del documento US 2008/0025980:

SEQ ID NO: 20 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 118):

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTSFNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY
AEEFKGRFVFLDTSVSTAYLQITSLTAEDTGMVFCYKGYDALDYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 21 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 119):

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTSFNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY
AEEFKGRFVFLDTSVSTAYLQITSLTAEDTGMVFCYKGYDALDYWGQGLTLTVSS;

10 SEQ ID NO: 22 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 120):

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTSFNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY
AEEFKGRFVFLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMVFCYKGYDALDYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 23 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 121):

QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTSFNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY
AEEFKGRFVFLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMVFCYKGYDALDYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 24 del documento US 2008/0025980 (SEQ ID NO: 122):

15 QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTSFNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY
AEEFKGRFAFLDTSVNTAYLQITSLNAEDTGMVFCYKGYDALDYWGQGLTLTVSS.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:18 del documento US 2008/0025980 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:22 del documento US 2008/0025980.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende AMP-514 (también conocido como MEDI-0680).

20 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende la proteína de fusión PD-L2-FcAMP-224, que se describe en los documentos WO2010/027827 y WO 2011/066342. En una realización de este tipo, el resto de transporte dirigido puede incluir un dominio de transporte dirigido que comprende SEQ ID NO:4 del documento WO2010/027827 (SEQ ID NO: 123):

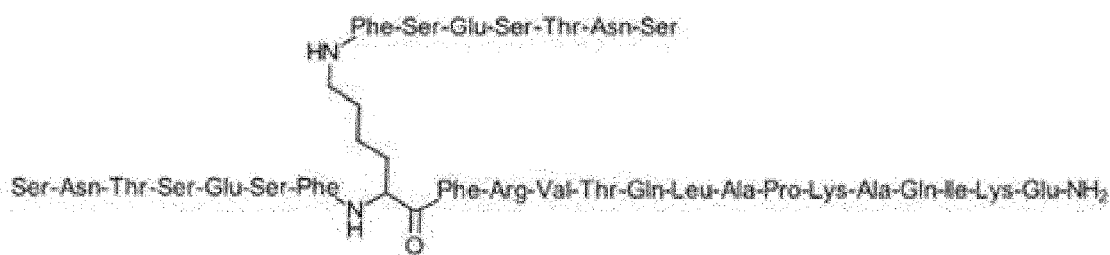
LFTVTPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAIATSLQKVENDTSPHRERATLLEEQ
LPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEV
ELTCQATGYPLAEVSWPNVSVANTSHSRTPEGLYQVTSVLRKLPKPPGRNFCVFWNTHV
RELTLASIDLQSQMEPRTHPTWLLHIFIPFCIIAFIFIATVIALRKQLCQKLYSSKDTTK
RPVTTTKREVNSAI

y/o la proteína de fusión B7-DC que comprende SEQ ID NO:83 del documento WO2010/027827 (SEQ ID NO: 124):

MIFLLMLSLLEQLHQAALFTVTPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAIATSLQ
KVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIYGVAWDYKYLTLKVK
ASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSVANTSHSRTPEGLYQVTSVL
RLKPPKPPGRNFCVFWNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

25 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el péptido AUNP 12 o cualquiera de los otros péptidos descritos en los documentos US 2011/0318373 o 8 907 053. Por ejemplo, el resto de transporte dirigido puede comprender AUNP 12 (es decir, el compuesto 8 o SEQ ID NO:49 del documento US 2011/0318373) que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 125:

SNTSESFK (SNTSESF) FRVTQLAPKAQIKE-NH₂



En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-1 1E3, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 1E3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una

5

EVQLQQSGPV LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYYMNWVKQS HGKSLEWIGN
INPYNGGTTY NQKFKGKATL TVDKSSRTAY MEINSLTSED SAVYYCARGR
IYDGSLDYWG QGTALT VSS (SEQ ID NO: 126);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQFPSS LCASQGGKVT VTCKASQDIN NYMAWYQHKP GKGPRLLIHY
TSTLLSGIPS RFGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLWTFGGG
TKLEIK (SEQ ID NO: 127).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-1 1E8, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 1E8 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una

10

EVQLQQSGAE LAKPGASVRL SCKASGYTFT NYWMHWVKQR PGQGLEWIGH
INPSSGFTTY NQNFKDKATL TADKSSNTAY MQLSSLTYED SAVYFCARED
YDVDYWGQGT TLT VSS (SEQ ID NO: 128);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

15

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQSD TNVAWYQQKP GQSPKALIFS
ASYRYSQVPD RFTGSGSGTD FTLTINSVQS EDLAEIFCQQ YNSYPYTFGS
GTKLEIK (SEQ ID NO: 129).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-1 1H3, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 1H3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una

20

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSGSYTIYY TDTVKGRTI SRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCARRG
YGSFYEYYFD YWQGTTLTV SS (SEQ ID NO: 130);

y/o una región variable de la cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de:

QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMYWYQQKPR SSPKPWIYLT
SNLASGVPAR FSGSGCTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG
TKLEIK (SEQ ID NO: 131).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende un VHH dirigido contra PD-1 como se divulga, por ejemplo, en los documentos US 8 907 065 y WO 2008/071447. En realizaciones ilustrativas, los VHH contra PD-1 comprenden SEQ ID NO: 347-351 del documento US 8 907 065:

SEQ ID NO: 347 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 132):

EVQLVESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSI FSIHAMGWFRQAPGKEREFVAA
ITWSGGITYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAADR
AESSWYDYWGQGTQVTVSS;

5

SEQ ID NO: 348 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 133):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAV
ITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAGDK
HQSSWYDYWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 349 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 134):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSIHAMGWFRQAPGKEREFVAA
ITWSGGITYYADSLKGRFTISRDNKNTGYLQMNSLKPEDTAIYYCAADR
AQSSWYDYWGQGTQVTVSS;

10

SEQ ID NO: 350 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 135):

EVQLVESGGGLVQAGGSLGLSCAASGSI FSIINAMAWFRQAPGKEREFVAL
ISWSGGSTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAADR
VDSNWDYWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 351 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 136):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFS SGTMGWFRRAPGKEREFVA
SIPWSGGRIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVK
ERSTGWDFASWGQGTQVTVSS.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1, o fragmentos de los mismos, divulgados en los documentos US2011/0271358 y WO2010/036959. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25-29 del documento US2011/0271358:

SEQ ID NO: 25 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 137):

QVQLVQSGAELKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEY
NQKFCDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQTSVTVS
S;

20

SEQ ID NO: 26 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 138):

QVQLVQSGAEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEY
NQKFCDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY3/d10CARWRDSSGYHAMDYWGQTSVTVS
S;

SEQ ID NO: 27 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 139):

QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEY
NQKFCDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQTLVTVS
S;

25

SEQ ID NO: 28 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 140):

QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEY
NQKFCDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQTLVTVS
S;

SEQ ID NO: 29 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 141):

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSKASGYSFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEY
NQKFCDRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQTLVTVS
S;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 30-33 del documento US2011/0271358:

SEQ ID NO: 30 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 142):

DIVLTQSPASLTLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHYQQKPDQSPKLLIKFGSNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK;

5 SEQ ID NO: 31 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 143):

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHYQQKPDQSPKLLIKFGSNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 32 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 144):

EIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHYQQKPDQSPKLLIKFGSNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 33 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 145):

10 DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHYQQKPDQSPKLLIKFGSNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK.

En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende uno o más anticuerpos dirigidos contra PD-1, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, seleccionados de TSR-042 (Tesar, Inc.), REGN2810 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) y BGB-A317 (BeiGene Ltd.)

15 En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se unen selectivamente a un polipéptido de PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína quimérica comprende uno o más anticuerpos, derivados o formatos de anticuerpos, péptidos o polipéptidos, o proteínas de fusión que se unen selectivamente a un polipéptido de PD-L1.

20 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 MEDI4736 (también conocido como durvalumab), o fragmentos del mismo. MEDI4736 es selectivo para PD-L1 y bloquea la unión de PD-L1 a los receptores de PD-1 y CD80. MEDI4736 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden una cadena pesada y una cadena ligera o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. La secuencia de MEDI4736 se divulga en el documento WO/2016/06272. En realizaciones ilustrativas, MEDI4736 o un fragmento de unión al antígeno del mismo
25 para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
IKQDGSEKYY VDSVKGRTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG
GWFGEIAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSVSV TVPSSSLGTQ
TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIETI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCPS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 146);

y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSFPWTFG
QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCCLNNE YPREAKVQWK
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ
30 GLSSPVTKSF NRGEK (SEQ ID NO: 147).

En realizaciones ilustrativas, el MEDI4736 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 del documento WO/2016/06272 (SEQ ID NO: 148):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYY
VDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVS
S;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 del documento WO/2016/06272 (SEQ ID NO: 149):

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLWTFGQGTKVEIK

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab (también conocido como MPDL3280A, RG7446), o fragmentos del mismo. En realizaciones ilustrativas, el atezolizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 150);

- 10 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSGSG
TDFTLTITSSLPEDFATYYCQQLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 151).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 avelumab (también conocido como MSB0010718C), o fragmentos del mismo. En realizaciones ilustrativas, avelumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una

- 15 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS
IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNTKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK
LGTVTITVDYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVSVLT VLHQLDNLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCFSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 152);

y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI
YDVSNRPSGV SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV
FGTGKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV
AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT
HEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID NO: 153).

- 20 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 BMS-936559 (también conocido como 12A4, MDX-1 105), o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, BMS-936559 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKTSGDTFSTYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGKAHY
AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTITV
VSS (SEQ ID NO: 154);

- 25 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNWPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 155).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 3G10, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 3G10 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYGFSWVRQAPGQGLEWMGWITAYNGNTNY
AQLQLQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARDYFYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 156);

5

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLWVYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFGSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 157).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 10A5, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 10A5 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDVHWVRQAPGQRLWGMGLHADTGITKF
SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERIQWFDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 158);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS
RFGSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 159).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 5F8, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 5F8 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

15

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGGIFSTYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANH
AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQGIAAALFDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 160);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFGSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 161).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 10H10, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 10H10 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

25

EVQLVESGGGLVQPGFGRSLRLSCAVSGFTDDYVHWVRQAPGKGLEWVSGISGNSGNIGY
ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTALYYCAVPFDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 162);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS
RFGSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 163).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 1B12, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 1B12 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

30

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGDTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGRAHY
AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 164);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 165).

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 7H1, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 7H1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGGTFFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGKAHY
AQKFQGRVTITADESTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKYDYVSGSPFGMDVWGQGTITVT
VSS (SEQ ID NO: 166);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 167).

- 10 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 11E6, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 11E6 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGSANY
AQKFQDRVTITADESTSAAYMELSSLRSEDTAVYYCARDSSGWSRYMDVWGQGTITVTVS
S (SEQ ID NO: 168);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 15 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 169).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 12B7, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 12B7 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 20 QVQLVQSGAEVKEPGSSVKVCKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGIAHY
AQKFQGRVTITADESTNTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARKYSYVSGSPFGMDVWGQGTITVT
VSS (SEQ ID NO: 170);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTREIK (SEQ ID NO: 171).

- 25 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 13G4, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2013/0309250 y WO2007/005874. En realizaciones ilustrativas, 13G4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGITFDDYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNRGRIEY
ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKGRFRYFDWFLDYWGQGTITVTVS
S (SEQ ID NO: 172);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 173).

- 30 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 1E12, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 1E12 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVKLQESGPS LVKPSQTLST TCSVTGYSIT SDYWNWIRKF PGNKLEYVGY
ISYTGSTYYN PSLKSRISIT RDTSKNQYYL QLNSVTSEDT ATYYCARYGG
WLSPPFDYWQ GTTLTVSS (SEQ ID NO: 174);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIVMTQSHKL MSTSVGDRVS ITCKASQDVG TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW
ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFCQQ DSSYPLTFGA
GTKVELK (SEQ ID NO: 175).

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 1F4, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 1F4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLQESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT TYSINWIRQP PGKGLEWLGW
MWAGGGTNSN SVLKSRLLIS KDNSKQVFL KMNSLQTDDE ARYYCARYYG
NSPYAIDYW GQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 176);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIVTTQSHKL MSTSVGDRVS ITCKASQDVG TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW
ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFCQQ DSSYPLTFGA
GTKVELK (SEQ ID NO: 177).

- 10 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2G11, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 2G11 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVKLQESGPS LVKPSQTLST TCSVTGYSII SDYWNWIRKF PGNKLEYLGY
ISYTGSTYYN PSLKSRISIT RDTSKNQYYL QLNSVTTEDE ATYYCARRGG
WLLPFDYWGQ GTTLTVSS (SEQ ID NO: 178);

- 15 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIVMTQSPSS LAVSVGEKVS MGCKSSQSLL YSSNQKNSLA WYQQKPGQSP
KLLIDWASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCQYYGY
PLTFGAGTKL ELK (SEQ ID NO: 179).

- 20 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 3B6, o fragmentos del mismo, según se divulga en el documento US 2014/0044738. En realizaciones ilustrativas, 3B6 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVKLQESGPS LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYDINWVKQR PGQGLEWIGW
IFPRDNNTKY NENFKGKATL TVDTSSTAY MELHSLTSED SAVYFCTKEN
WVGDFDYWGQ GTTLTLSS (SEQ ID NO: 180);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIVMTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSIR YMHYQQKPG TSPKRWISDT
SKLTSGVPAR FSGSGGTSY ALTISSMEAE DAATYYCHQR SSYPWTFGGG
TKLEIK (SEQ ID NO: 181).

- 25 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 3D10, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos US 2014/0044738 y WO2012/145493. En realizaciones ilustrativas, 3D10 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLQQSGPD LVTPGASVRI SCQASGYTFP DYIMNWKQS HGKSLEWIGD
IDPNYGGTTY NQKFKGKAIL TVDRSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARGA
LTDWGQGTSL TVSS (SEQ ID NO: 182);

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIYWFQQKPG SSPKPWIYAT
FNLASGVPAR FSGSGGTSY SLTISRVEE DAATYYCQW SNNPLTFGAG
TKLELK (SEQ ID NO: 183).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en los documentos US2011/0271358 y WO2010/036959. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 34-38 del documento US2011/0271358:

SEQ ID NO: 34 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 184):

EVQLVQSGPELKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFPNDGTTY
NEMFKGRATLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTLLTVTVSS;

SEQ ID NO: 35 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 185):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFPNDGTTY
NEMFKGRATLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLLTVTVSS;

SEQ ID NO: 36 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 186):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFPNDGTTY
NEMFKGRATLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLLTVTVSS;

SEQ ID NO: 37 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 187):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFPNDGTTY
NEMFKGRATLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLLTVTVSS;

SEQ ID NO: 38 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 188):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFPNDGTTY
NEMFKGRATITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLLTVTVSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 39-42 del documento US2011/0271358:

SEQ ID NO: 39 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 189):

DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEEEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 40 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 190):

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 41 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 191):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 42 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 192):

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2.7A4, o fragmentos del mismo, según se divulga en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 2.7A4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 2 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 193):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSGDYIYY
ADSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNSLKAEDTAVYYCARDLVTSMAFDYWGQGTLLTVTVSS;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 7 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 194):

SYELTQPPSVSVSPGQAARITCSGDALPQKYVFWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPER

FSGSSSGTMATLTISGAQVEADYYCYSTDRSGNHRVFGGGTRLTVL.

5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2.9D10, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 2.9D10 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 12 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 195):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGGEQYY
VDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWNYGYDMDVWGQGTITVTVSS;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

10 SEQ ID NO: 17 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 196):

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWFQQKPGQAPRLIFGTSSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSIFTFGPGTKVDIK.

15 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2.14H9, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 2.14H9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 22 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 197):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYY
VDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTITVTVS
S;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

20 SEQ ID NO: 27 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 198):

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLIYDASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGLPWTFGQGTVEIK.

25 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2.20A8, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 2.20A8 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 32 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 199):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIRGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLHYDSSGYLDYWGQGTITVTVS
S;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

30 SEQ ID NO: 37 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 200):

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAISSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK.

35 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 3.15G8, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 3.15G8 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 42 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 201):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGGEKYY
VDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVQLYSDYFDYWGQGTITVTVSS;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 47 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 202):

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKSGKAPKLLIYAASGLQSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDLATYYCQQSHSLPPTFGQGTKVEIK.

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 3.18G1, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 3.18G1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 52 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 203):

EVQLLES GGD LVQ PGG SLRL SCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGFTFS
ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRVEDSAVYSCAKVLVGFNNGCWDYWGQGT LVTVS
S;

- 10 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 57 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 204):

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPER
FSGSNSGTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSNDHVVFGGGTKLTVL.

- 15 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2.7 MOPT, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 2.7A4OPT o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 62 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 205):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGDIYY
ADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVTSMVAFDYWGQGT LVTVSS;

- 20 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 67 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 206):

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPQKYVFWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPER
FSGSSSGTMATLTISGAQVEADYYCYSTRSGNHRVFGGGTKLTVL.

- 25 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-PD-L1 2.14H9OPT, o fragmentos del mismo, según se describe en los documentos WO 2011/066389, US8 779 108 y US2014/0356353. En realizaciones ilustrativas, 2.14H9OPT o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 72 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 207):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYY
VDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGT LVTVS
S;

- 30 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 77 del documento WO 2011/066389 (SEQ ID NO: 208):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQVRSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGS LPTFGQGTKVEIK.

- 35 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en el documento WO2016/061142. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 18, 30, 38, 46, 50, 54, 62, 70 y 78 del documento WO2016/061142:

SEQ ID NO: 18 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 209):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMYWVRQATGQGLEWMGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 30 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 210):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMYWVRQATGQGLEWMGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 38 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 211):

5 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMYWVRQAPGQGLEWMGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 46 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 212):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMYWIRQSPSRGLEWLGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATATYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 50 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 213):

10 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMYWIRQPPGKLEWIGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 54 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 214):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMYWIRQSPSRGLEWLGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 62 del documento WO2016/061142: (SEQ ID NO: 215)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMYWVRQARGQRLEWIGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATATYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

15 SEQ ID NO: 70 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 216):

QITLKESGPTLVKPTQTTLTCTFSGYTFTSYWMYWVRQAPGKLEWVSRIDPNSGSTKY
NEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 78 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 217):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMYWVRQARGQRLEWIGRIDPNSGSTKY
NEKFKNRFTISRDNSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQGTTVTVSS;

20 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 22, 26, 34, 42, 58, 66, 74, 82 y 86 del documento WO2016/061142:

SEQ ID NO: 22 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 218):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCKASQDVGTAVAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRHTGIPA
RFGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 26 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 219):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRHTGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

25 SEQ ID NO: 34 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 220):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCKASQDVGTAVAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRHTGVDP
RFGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 42 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 221):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCKASQDVGTAVAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRHTGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK.

SEQ ID NO: 58 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 222):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQDVGTAVAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRHTGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 66 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 223):

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVGTAVAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRHTGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 74 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 224):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRHTGVPS
RFSGSGSGTDFTFITISLQPDIAATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

5

SEQ ID NO: 82 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 225):

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRHTGVPS
RFSGSGSGTDFTFITISLQAEADAATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 86 del documento WO2016/061142 (SEQ ID NO: 226):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRHTGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK.

10 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en el documento WO2016/022630. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 y 46 del documento WO2016/022630:

15 SEQ ID NO: 2 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 227):

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFI FRSYGMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGSTYYP
DSVKGRFTISRDNARNILYLQMSLSRSEDATAMDCARGYDSGFAYWGQGLTVTVSE;

SEQ ID NO: 6 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 228):

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFRSYGMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGSTYYP
DSVKGRFIIISRDNARNILYLQMSLSRSEDATAMYYCAKGYDSGFAYWGQGLTVIVSA;

SEQ ID NO: 10 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 229):

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGVTTDYN
AAFMSRLTITKDNNSKSQVFFKMNSLQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGSTVTVSS;

20

SEQ ID NO: 14 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 230):

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGVTDYN
AAFISRLSISKDNNSKSQVFFKMNSLQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGSTVTVSS;

SEQ ID NO: 18 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 231):

EVKLFESEGGGLVQPGGSLKLSCVASGFDFSTYWMHWVRQAPGQGLEWIGQINPDSTTINY
APSLKDRFIIISRDNANKNTLFLQMSKVRSEDATALYYCAKPGDYGDFDCWGQGTTLTVSS;

25

SEQ ID NO: 22 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 232):

EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYSGSTYYN
PSLKSRIISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCARSLWLFSTGFAYWGQGLTVTVSA;

SEQ ID NO: 26 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 233):

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGITDYN
AAFKSRLSISKDNNSKSQVFFKMNSLQANDTAIYFCARLGFYAMDYWGQGSTVTVSS;

SEQ ID NO: 30 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 234):

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFRSYGMSWARQIPEKRLEWVASISSGGTTYL
GSVQGRFTISRDNARNILYLQMSLSRSEDATAMYYCARGYDAGFAYWGQGLTVSVSE;

30

SEQ ID NO: 34 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 235):

EVQLQESGPSLVKPSQTLSTLCSVTGDSITSGYWTWIRKFPGNKLEYMGYISYTGSTYYN
PSLKSRISISRDTSKSQYYLQLNSVTTEDTATYYCARQRDWLGFAFWGQGTLLVTASA;

SEQ ID NO: 38 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 236):

EEKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSSYGMWVRQTPEKRLEWVASISSGGSIYYP
DSVKGRFTISRDNARNILYLQMSLSRSEDAMYYCARGYDAGFAFWGQGTLLVTASA;

5 SEQ ID NO: 42 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 237):

QITLKESGPTLVKPTQTTLTLCTVSGFSLSTYGVHWIRQPPGKALEWLGVWIRGVTTDYN
AAFMSRLTITKDNSKNQVVLTMNMDPVDATYYCARLGFYAMDYWGQGTLLVTVSS;

SEQ ID NO: 46 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 238):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFRSYGMWVRQAPGKGLEWVASISSGGSTYYP
DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMSLSRAEDTAVYDCARGYDSGFAYWGQGTLLVTVSS;

10 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 del documento WO2016/022630:

SEQ ID NO: 4 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 239):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSSFMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIKR;

SEQ ID NO: 8 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 240):

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSSYMHYQQKPGQPPKLLIKYASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK;

15 SEQ ID NO: 12 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 241):

SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLIYYAANRYTGVPD
RFTGSGYGTDFTTISIVQAEDLAVYFCQQDYTSPTYTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 16 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 242):

SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYSGVPD
RFTGSGYGTDFTTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPTYTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 20 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 243):

20 DVLMTQTPLYLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNANTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNR
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 24 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 244):

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSSSYLYWNQKPGSSPKVWIYNTSNLASGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAASYFCHQWRSYPPTLGAGTKLELK;

SEQ ID NO: 28 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 245):

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSANSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAR
FSGSGSGTSYSLTISMGAEADAATYYCQQWSSNPWTFGGGTKLEIK;

25 SEQ ID NO: 32 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 246):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSYMHYQQKPGQPPKLLIKYASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQNSWEIPYTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 36 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 247):

DIVMTQTPSSLAVSLGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYQQKPGQSPKLLIYWASNR
ESGVPDRFTGSSSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLELK;

SEQ ID NO: 40 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 248):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYVHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 44 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 249):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGKAPKLLIYYAANRYTGVPD
RFSGSGYGTDFTTISSLPEDIATYFCQQDYTSPYTFGGGTKLEIK;

SEQ ID NO: 48 del documento WO2016/022630 (SEQ ID NO: 250):

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASQSVSTSSSSFMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en el documento WO2015/112900. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 38, 50, 82 y 86 del documento WO 2015/112900:

SEQ ID NO: 38 del documento WO2015/112900 (SEQ ID NO: 251):

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYPGTGGSNF
DEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 50 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 252):

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWIRQSPSRGLEWLGNIYPGTGGSNF
DEKFKNRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 82 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 253):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWIRQSPSRGLEWLGNIYPGTGGSNF
DEKFKNRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGTTVTVSS;

SEQ ID NO: 86 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 254):

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPGTGGSNF
DEKFKNRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGTTVTVSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 42, 46, 54, 58, 62, 66, 70, 74 y 78 del documento WO 2015/112900:

SEQ ID NO: 42 del documento WO2015/112900 (SEQ ID NO: 255):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLD SGNQKNFLT WYQQKPGQAPRLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD DFATYYCQNDY SYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 46 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 256):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLD SGNQKNFLT WYQQKPGQAPRLLIYWASTR
ESGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCQNDY SYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 54 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 257):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLD SGNQKNFLT WYQQKPGKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQNDY SYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 58 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 258):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCKSSQSLD SGNQKNFLT WYQQKPGQAPRLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDY SYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 62 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 259):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLD SGNQKNFLT WYQQKPGKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDY SYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 66 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 260):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCKSSQSLDLSGNQKNFLTQYQQKPGQAPRLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 70 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 261):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLDLSGNQKNFLTQYQQKPGQAPRLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 74 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 262):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLDLSGNQKNFLTQYQQKPGQSPQLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 78 del documento WO 2015/112900 (SEQ ID NO: 263):

DVVMTQSPSLPVTLGQPAISCKSSQSLDLSGNQKNFLTQYQQKPGKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en los documentos WO 2010/077634 y US 8 217 149. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 20 del documento WO 2010/077634 (SEQ ID NO: 264):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVTLSA;

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 21 del documento WO 2010/077634 (SEQ ID NO: 265):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 que pueden obtenerse a partir del hibridoma accesible con los números de depósito CNCM I-4122, CNCM I-4080 y CNCM I-4081 según se divulga en el documento US 20120039906.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende un VHH dirigido contra PD-L1 como se divulga, por ejemplo, en los documentos US 8 907 065 y WO 2008/071447. En realizaciones ilustrativas, los VHH contra PD-L1 comprenden SEQ ID NO: 394-399 del documento US 8 907 065:

SEQ ID NO: 394 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 266):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREWASS
ISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVFLQMNSLKPEDTAVYSCAASQ
APITITATMMKPFYDYWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 395 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 267):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAKCWFRQAPGKEREWVSC
ISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVFLQMNSLKPEDTAVYFCAARH
GGPLTVEYFFDYWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 396 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 268):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYYAIGWFRQAPGKAREGVSC
ISGGDNSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVFLQMNSLKPEDTAVYYCATGG
WKYCSGYDPEYIYWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 397 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 269):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSQYDVGWYRQAPGKQRELVA
FSSSGGRTIYPDSVKGRFTFSRDNTKNTVFLQMTSLKPEDTAVYYCKIDW
YLSNYSWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 398 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 270):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVDSNSAMGWYRQAPGKQREWVAR
ITGGGLIAYTDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNPLEPDTAVYYCNTINS
RDGWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 399 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 271):

EVQLVESGGGLVQAGGSLTISCAASGITFSDSIVSWYRRARGKQREWVAG
ISNGGTTKYAESVLGRFTISRDNAKNNVYLQMNGLNPEDTAVYLCKVRQY
WGQGTQVTVSS.

5 En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra PD-L2. En algunas realizaciones, la proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se unen selectivamente a un polipéptido de PD-L2. En algunas realizaciones, la proteína quimérica comprende uno o más anticuerpos, derivados o formatos de anticuerpos, péptidos o polipéptidos, o proteínas de fusión que se unen selectivamente a un polipéptido de PD-L2.

10 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende un VHH dirigido contra PD-L2 como se divulga, por ejemplo, en los documentos US 8 907 065 y WO 2008/071447. En realizaciones ilustrativas, los VHH contra PD-1 comprenden SEQ ID NO: 449-455 del documento US 8 907 065:

SEQ ID NO: 449 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 272):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASESTVLINAMGWYRQAPGKQRELVAS
ISSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNADVY
PQDYGLGYVEGKVYYGHDYWGTTGLVTVSS;

SEQ ID NO: 450 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 273):

15 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSNYVSNYAMGWGRQAPGTQ
RELVASISNGDNTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY
CFEHQVAGLTWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 451 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 274):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGXALKIXVMGWYRQAPGKQRELV
AAITSGGRTNYSVSVKGRFTISGDNAXNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCRE
WNSGYPPVDYWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 452 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 275):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSGTMGWFRRAPGKEREFFV
ASIPWSSGRTYYADSVKDRFTISRDNAXNTVFLQMNSLKPEDTAVYYCAF
KERSTGWDFASWGQGIQVTVSS;

20 SEQ ID NO: 453 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 276):

EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFTLDYYGIGWFRQAPGKEREVS
FISGSDGSTYYAESVKGRFTISRDKAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAD
PWGPPSIATMTSYEYKHWGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 454 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 277):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMWLRRAPGKGFEWV
STIDKDGNTNYVDSVKGRFAVSRDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCTK
HGSSARGQGTQVTVSS;

SEQ ID NO: 455 del documento US 8 907 065 (SEQ ID NO: 278):

25 EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCVASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE
WVSTINSGGGITYRGSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYY
CENGSSYRRGQGTQVTVSS.

30 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L2 divulgados en los documentos US2011/0271358 y WO2010/036959. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 43-47 del documento US2011/0271358:

SEQ ID NO: 43 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 279):

QVQLVQSGAELKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEY
NQKFKDRITTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARPWFAYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 44 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 280):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEY
NQKFKDRITTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 45 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 281):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEY
NQKFKDRITTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 46 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 282):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEY
NQKFKDRITTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGLTLTVSS;

SEQ ID NO: 47 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 283):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEY
NQKFKDRITITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGLTLTVSS;

10 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 48-51 del documento US2011/0271358:

SEQ ID NO: 48 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 284):

DIVMTQSPASLTVPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 49 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 285):

DIVMTQSPASLSVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 50 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 286):

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 51 del documento US2011/0271358 (SEQ ID NO: 287):

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR

ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK.

En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido de la invención pueden comprender una secuencia que se dirige a PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, que es al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 61 %, al menos aproximadamente un 62 %, al menos aproximadamente un 63 %, al menos aproximadamente un 64 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 66 %, al menos aproximadamente un 67 %, al menos aproximadamente un 68 %, al menos aproximadamente un 69 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 71 %, al menos aproximadamente un 72 %, al menos aproximadamente un 73 %, al menos aproximadamente un 74 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 76 %, al menos aproximadamente un 77 %, al menos aproximadamente un 78 %, al menos aproximadamente un 79 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento (por ejemplo, tiene aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 61 %, o aproximadamente un 62 %, o aproximadamente un 63 %, o aproximadamente un 64 %, o aproximadamente un 65 %, o aproximadamente un 66 %, o aproximadamente un 67 %, o aproximadamente un 68 %, o aproximadamente un 69 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 71 %, o aproximadamente un 72 %, o aproximadamente un 73 %, o aproximadamente un 74 %, o aproximadamente un 75 %, o aproximadamente un 76 %, o aproximadamente un 77 %, o aproximadamente un 78 %, o aproximadamente un 79 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 81 %, o aproximadamente un 82 %, o aproximadamente un 83 %,

o aproximadamente un 84 %, o aproximadamente un 85 %, o aproximadamente un 86 %, o aproximadamente un 87 %, o aproximadamente un 88 %, o aproximadamente un 89 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento).

En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido de la invención pueden comprender cualquier combinación de secuencias de cadena pesada, cadena ligera, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, región determinante de la complementariedad (CDR) y región marco que se dirigen a PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 como se describe en el presente documento.

Otros anticuerpos, derivados o formatos de anticuerpos, péptidos o polipéptidos, o proteínas de fusión que se unen selectivamente o se dirigen a PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 se divulgan en los documentos WO 2011/066389, US 2008/0025980, US 2013/0034559, US 8 779 108, US 2014/0356353, US 8 609 089, US 2010/028330, US 2012/0114649, WO 2010/027827, WO 2011/066342, US 8 907 065, WO 2016/062722, WO 2009/101611, WO2010/027827, WO 2011/066342, WO 2007/005874, WO 2001/014556, US2011/0271358, WO 2010/036959, WO 2010/077634, US 8 217 149, US 2012/0039906, WO 2012/145493, US 2011/0318373, patente de EE. UU. n.º 8 779 108, US 20140044738, WO 2009/089149, WO 2007/00587, WO 2016061142, WO 2016/02263, WO 2010/077634 y WO 2015/112900.

En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD8 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los agentes de señalización modificados (por ejemplo, mutantes) descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 sobre linfocitos T y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.

En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD4 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD4 sobre linfocitos T y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.

En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD3, CXCR3, CCR4, CCR9, CD70, CD103, o uno o más marcadores de punto de control inmunitario y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD3 sobre linfocitos T y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra CD3 expresado sobre linfocitos T. En algunas realizaciones, la proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se unen selectivamente a un polipéptido de CD3. En algunas realizaciones, la proteína quimérica comprende uno o más anticuerpos, derivados o formatos de anticuerpos, péptidos o polipéptidos, o proteínas de fusión que se unen selectivamente a un polipéptido de CD3.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-CD3 muromonab-CD3 (también conocido como Orthoclone OKT3), o fragmentos del mismo. Muromonab-CD3 se divulga en la patente de EE. UU. n.º 4 361 549 y Wilde *et al.* (1996), 51:865-894. En realizaciones ilustrativas, muromonab-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN
 NQKFQDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSA
 KTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL
 YTLSSSVTVTSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDKKIEPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 288);

y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAH
 FRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRADTAPTVSIFPPS
 SEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT
 TKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 289).

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-CD3 oteixizumab, o fragmentos del mismo. El oteixizumab se describe en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20160000916 y Chatenoud *et al.* (2012), 9:372-381. En realizaciones ilustrativas, el oteixizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSSFPMAWVRQAPGKLEWVSTISTSGGRITYYRDSVKGRF
 TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 290);

- 10 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQLTQPNVSTSLGSTVVKLSCTLSGGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKRPDGVDPDRFSGSID
 RSSNSAFLTIHNVAIEDAIIYFCHSYVSSFNVEGGGKLTVLRLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL
 VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS
 TVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 291).

- 15 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-CD3 teplizumab (también conocido como MGA031 y hOKT3γ1(Ala-Ala)), o fragmentos del mismo. El teplizumab se describe en Chatenoud *et al.* (2012), 9:372-381. En realizaciones ilustrativas, el teplizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRF
TISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 292);

y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGT
DYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTQLQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSENRGEC (SEQ ID NO: 293).

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-CD3 visilizumab (también conocido como Nuvion®, HuM291), o fragmentos del mismo. El visilizumab se divulga en los documentos US 5 834 597 y WO2004052397, y Cole et al., Transplantation (1999), 68:563-571. En realizaciones ilustrativas, visilizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTHYNQKLKDKA
TLTADKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 294);

10

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKR LIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 295).

15

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende el anticuerpo anti-CD3 foralumab (también conocido como NI-0401), o fragmentos del mismo. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 divulgados en los documentos US20140193399, US 7 728 114, US20100183554 y US 8 551 478.

En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 6 del documento US 7 728 114:

20

SEQ ID NO: 2 del documento US 7 728 114 (SEQ ID NO: 296):

QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKKYY
VDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVT VSS;

SEQ ID NO: 6 del documento US 7 728 114 (SEQ ID NO: 297):

QVQLVQSGGGVVPQSGRSLRLSCAASGKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKKYY
VDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRG EDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVT VSS;

25

y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 8 del documento US 7 728 114:

SEQ ID NO: 4 del documento US 7 728 114 (SEQ ID NO: 298):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPITFGGGTKVEIK;

SEQ ID NO: 8 del documento US 7 728 114 (SEQ ID NO: 299):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA

RFGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK;

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 del documento US 7 728 114 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 del documento US 7 728 114. En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 divulgados en el documento US2016/0168247. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 6-9 del documento US2016/0168247:

SEQ ID NO: 6 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 300):

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT

YYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT

TVSS;

SEQ ID NO: 7 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 301):

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT

YYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT

TVSS;

SEQ ID NO: 8 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 302):

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT

YYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT

TVSS;

SEQ ID NO: 9 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 303):

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT

YYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT

TVSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 10-12 del documento US2016/0168247:

SEQ ID NO: 10 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 304):

QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGV

PARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL;

SEQ ID NO: 11 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 305):

QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGV

PARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL;

SEQ ID NO: 12 del documento US2016/0168247 (SEQ ID NO: 306):

QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGV

PARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL.

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 divulgados en el documento US2015/0175699. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9 del documento US2015/0175699:

SEQ ID NO: 9 del documento US2015/0175699 (SEQ ID NO: 307):

QVQLVQSGSELEKPKGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTN
 NQKFKDRATLTDDKSTSTAYMQLSSLRSEDTAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGLTVTVSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 10 del documento US2015/0175699:

5 SEQ ID NO: 10 del documento US2015/0175699 (SEQ ID NO: 308):

QIVLTQSPATLSLSPGERATMSCSASSSVSYMNWYQQKPKAPKRWIYDTSKLASGVPSR
 FRGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQWSSNPFTFGGGTKVEIK.

10 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 divulgados en el documento US 8 784 821. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98 y 114 del documento US 8 784 821:

SEQ ID NO: 2 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 309):

ELQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY
 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARLSPYCTNGVCWDAFDIWGQGT
 MVTSS;

SEQ ID NO: 18 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 310):

ELQLVESGGGLVKPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTT
 EYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTPQLWLLQDAFDIWGQGTMTV

15 SS;

SEQ ID NO: 34 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 311):

ELQLVESGPGLVKPSGTLSTLCAVSGGSISSRNWWSWVRQPPGKGLEWIGDIYHSGSTNY
 NPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASGYTSCRDAFDIWGQGTMTVTVSS;

SEQ ID NO: 50 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 312):

ELQLVEWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYN
 PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRGRFLGWLLGGSNWFDPWQGT
 LTVTVSS;

20 SEQ ID NO: 66 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 313):

ELQLVEWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYN
 PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPDRMGHGFDIWGQGTMTVTVSS;

SEQ ID NO: 82 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 314):

ELQLVESGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWY
 NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDRRRIAARQYYGMDVWGQG
 TTVTVSS;

SEQ ID NO: 98 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 315):

ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWVRQAPGKGLEWVSAVSGSGGSTYY
 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAKFLGHYYGMDVWGQGTTVTVS

25 S;

SEQ ID NO: 114 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 316):

ES 2 981 745 T3

ELQLVESGPVLVKPTDTLTTLCTVSGFSLNNPRMGVSWIRQPPGKLEWLAHIFPSDAKA
HSASLKSRLTISKDTSKSQVVPMTNMDPVDATATYYCARILGEYYPFAWFDWPGQGLT
VSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106 y 122 del documento US 8 784 821:

SEQ ID NO: 10 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 317):

5

ELQMTQSPSSLSASVGDRVSITCRASQTISNYLNWYQLKPGKAPKLLIYAASLTQSEVPT
RFSGSGSGTDFTLTISGLHPEDFATYYCQQFNSYPRTEFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 26 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 318):

ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPTEFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO: 42 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 319):

ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGNYLAZYQQKPGQPPKMLIYWASIRESGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSNPQTEFGQGTKVEIK;

10

SEQ ID NO: 58 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 320):

ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTEFGQGTKVDIK;

SEQ ID NO: 74 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 321):

ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKSGKAPKLLIYAASSLTQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPWTTEFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 90 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 322):

15

ELVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAZYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPLTFGGGTKVEIK;

SEQ ID NO: 106 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 323):

ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLTQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNAPYTEFGQGTKVEIK;

SEQ ID NO: 122 del documento US 8 784 821 (SEQ ID NO: 324):

ELVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAZYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYLKIPYTEFGQGTKVEIK.

20

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende una cualquiera de las construcciones de unión anti-CD3 divulgadas en el documento US20150118252. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 6 y 86 del documento US20150118252:

25

SEQ ID NO: 6 del documento US20150118252 (SEQ ID NO: 325):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTNY
NQKFKDRVTMTTDTISISTAYMELSLRSDDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGLTIVTVSS;

SEQ ID NO: 86 del documento US20150118252 (SEQ ID NO: 326):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSRGYTNY
NQKFKDRVTMTTDTISISTAYMELSLRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGLTIVTVSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 3 del documento US2015/0175699:

SEQ ID NO: 3 del documento US20150118252 (SEQ ID NO: 327):

EVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLGSGVPAH
FRGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIK.

- 5 En una realización, el resto de transporte dirigido comprende una cualquiera de las proteínas de unión anti-CD3 divulgadas en el documento US2016/0039934. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 6-9 del documento US2016/0039934:

- 10 SEQ ID NO: 6 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 328):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT
LTVSS;

- SEQ ID NO: 7 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 329):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT
LTVSS;

- SEQ ID NO: 8 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 330):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGT
LTVSS;

15

- SEQ ID NO: 9 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 331):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSHFAYWGQGT
LTVSS;

y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1-4 del documento US2016/0039934:

- 20 SEQ ID NO: 1 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 332):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPG
VPSRFGSLIGDKATLTISLQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK;

- SEQ ID NO: 2 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 333):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPG
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK;

- SEQ ID NO: 3 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 334):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKALIGGTNKRAPG
VPSRFGSLIGDKATLTISLQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK;

25

- SEQ ID NO: 4 del documento US2016/0039934 (SEQ ID NO: 335):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPG
VPSRFGSLIGDKATLTISLQPEDFATYYCALWYSLWVFGQGTKVEIK;

En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido de la invención pueden comprender una secuencia que se dirige a CD3 que es al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 61 %, al menos aproximadamente un 62 %, al menos aproximadamente un 63 %, al menos aproximadamente un 64 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 66 %, al menos aproximadamente un 67 %, al menos aproximadamente un 68 %, al menos aproximadamente un 69 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 71 %, al menos aproximadamente un 72 %, al menos aproximadamente un 73 %, al menos aproximadamente un 74 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 76 %, al menos aproximadamente un 77 %, al menos aproximadamente un 78 %, al menos aproximadamente un 79 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o un 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento (por ejemplo, tiene aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 61 %, o aproximadamente un 62 %, o aproximadamente un 63 %, o aproximadamente un 64 %, o aproximadamente un 65 %, o aproximadamente un 66 %, o aproximadamente un 67 %, o aproximadamente un 68 %, o aproximadamente un 69 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 71 %, o aproximadamente un 72 %, o aproximadamente un 73 %, o aproximadamente un 74 %, o aproximadamente un 75 %, o aproximadamente un 76 %, o aproximadamente un 77 %, o aproximadamente un 78 %, o aproximadamente un 79 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 81 %, o aproximadamente un 82 %, o aproximadamente un 83 %, o aproximadamente un 84 %, o aproximadamente un 85 %, o aproximadamente un 86 %, o aproximadamente un 87 %, o aproximadamente un 88 %, o aproximadamente un 89 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 91 %, o aproximadamente un 92 %, o aproximadamente un 93 %, o aproximadamente un 94 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento).

En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido de la invención pueden comprender cualquier combinación de secuencias de cadena pesada, cadena ligera, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, región determinante de la complementariedad (CDR) y región marco que se dirigen a CD3 como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones, los restos de transporte dirigido de la invención pueden comprender cualquier secuencia de cadena pesada, cadena ligera, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, región determinante de la complementariedad (CDR) y región marco de los anticuerpos específicos de CD3 incluidos, entre otros, X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, FI 11-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, WT31 y F101.01. Estos anticuerpos específicos de CD3 son bien conocidos en la técnica y se describen, entre otros documentos, en Tunncliffe (1989), Int. Immunol., 1, 546-550.

Otros anticuerpos, derivados o formatos de anticuerpos, péptidos o polipéptidos, o proteínas de fusión que se unen selectivamente o se dirigen a CD3 se divulgan en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2016/0000916, patentes de EE. UU. n.ºs 4 361 549, 5 834 597, 6 491 916, 6 406 696, 6 143 297, 6 750 325 y la publicación internacional n.º WO 2004/052397.

En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD3 es un scFv. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD3 es:

```
QVQLQQSGAELARFGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYIN
PSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYS
LDYWGQGTTLTVSSGSTGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAIMSASPGEKVT
MTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPFAHFRGSGSGTSYSL
TISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 365).
```

En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a PD-1 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito B, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD70, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138, o CDw150; y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito B, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD19, CD20 o CD70 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

- 5 En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito B, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD20 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD20 sobre linfocitos B y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- 10 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD3 es un scFv. En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido de CD3 es:

```
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNL
ASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK
RGSTGGGSGGGGSGGGGSGVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTS
YNMHWVKQTPGRLGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQ
LSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWCAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 368).
```

- A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito NK, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a 2B4/SLAMF4, KIR2DS4, CD155/PVR, KIR3DL1, CD94, LMIR1/CD300A, CD69, LMIR2/CD300c, CRACC/SLAMF7, LMIR3/CD300LF, DNAM-1, LMIR5/CD300LB, Fc- ϵ psilon RII, LMIR6/CD300LE, Fc- γ RI/CD64, MICA, Fc- γ RIIb/CD32b, MICB, Fc- γ RIIC/CD32c, MULT-1, Fc- γ RIIA/CD32a, nectina-2/CD112, Fc- γ RIII/CD16, NKG2A, FcRH1/IRTA5, NKG2C, FcRH2/IRTA4, NKG2D, FcRH4/IRTA1, NKp30, FcRH5/IRTA2, NKp44, similar al receptor de Fc 3/CD16-2, NKp46/NCR1, NKp80/KLRF1, NTB-A/SLAMF6, Rae-1, Rae-1 α , Rae-1 β , Rae-1 delta, H60, Rae-1 ϵ psilon, ILT2/CD85j, Rae-1 γ , ILT3/CD85k, TREM-1, ILT4/CD85d, TREM-2, ILT5/CD85a, TREM-3, KIR/CD158, TREML1/TLT-1, KIR2DL1, ULBP-1, KIR2DL3, ULBP-2, KIR2DL4/CD158d, o ULBP-3; y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- 15
- 20

- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito NK, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a Kir1alfa, DNAM-1 o CD64 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- 25

- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito NK, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a KIR1 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra KIR1 sobre linfocitos NK y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- 30

- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito NK, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a TIGIT o KIR1 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra TIGIT sobre linfocitos NK y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- 35

- A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CLEC-9A, XCR1, RANK, CD36/SRB3, LOX-1/SR-E1, CD68, MARCO, CD163, SR-A1/MSR, CD5L, SREC-1, CLPI/COLEC12, SREC-II, LIMP1IISRB2, RP105, TLR4, TLR1, TLR5, TLR2, TLR6, TLR3, TLR9, ligando 4-IBB/TNFSF9, IL-12/IL-23 p40, 4-amino-1,8-naftalimida, ILT2/CD85j, CCL21/6Ccina, ILT3/CD85k, 8-oxo-dG, ILT4/CD85d, 8D6A, ILT5/CD85a, A2B5, Iutegrina α 4/CD49d, Aag, integrina β 2/CD18, AMICA, langerina, B7-2/CD86, leucotrieno B4 RI, B7-H3, LMIR1/CD300A, BLAME/SLAMF8, LMIR2/CD300c, Clq R1/CD93, LMIR3/CD300LF, CCR6, LMIR5/CD300LB, CCR7, LMIR6/CD300LE, CD40/TNFRSF5, MAG/Siglec-4-a, CD43, MCAM, CD45, MD-1, CD68, MD-2, CD83, MDL-1/CLEC5A, CD84/SLAMF5, MMR, CD97, NCAMLI, CD2F-10/SLAMF9, osteoactivina GPNMB, Chern 23, PD-L2, CLEC-1, RP105, CLEC-2, Siglec-2/CD22, CRACC/SLAMF7, Siglec-3/CD33, DC-SIGN, Siglec-5, DC-SIGNR/CD299, Siglec-6, DCAR, Siglec-7, DCIR/CLEC4A, Siglec-9, DEC-205, Siglec-10, dectina-1/CLEC7A, Siglec-F, dectina-2/CLEC6A, SIGNR1/CD209, DEP-1/CD148, SIGNR4, DLEC, SLAM, EMMPRIN/CD147, TCCR/WSX-1, Fc- γ R1/CD64, TLR3, Fc- γ RIIb/CD32b, TREM-1, Fc- γ RIIC/CD32c, TREM-2, Fc- γ RIIA/CD32a, TREM-3, Fc- γ RIII/CD16, TREML1/TLT-1, ICAM-2/CD102, o vainilloide R1; y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- 40
- 45
- 50

- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CLEC-9A, DC-SIGN, CD64, CLEC4A, o DEC205 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CLEC9A sobre células dendríticas y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CLEC9A y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CLEC9A sobre células dendríticas y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a XCR1 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra XCR1 sobre células dendríticas y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a RANK y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra RANK sobre células dendríticas y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- A modo de ejemplo no limitante, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un monocito/macrófago, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a SIRP1a, B7-1/CD80, ILT4/CD85d, B7-H1, ILT5/CD85a, cadena β del común, integrina α 4/CD49d, BLAME/SLAMF8, integrina α X/CD11c, CCL6/C10, integrina β 2/CD18, CD155/PVR, integrina β 3/CD61, CD31/PECAM-1, latexina, CD36/SR-B3, leucotrieno B4 R1, CD40/TNFRSF5, LIMP1/CD300A, CD43, LMIR1/CD300A, CD45, LMIR2/CD300c, CD68, LMIR3/CD300LF, CD84/SLAMF5, LMIR5/CD300LB, CD97, LMIR6/CD300LE, CD163, LRP-1, CD2F-10/SLAMF9, MARCO, CRACC/SLAMF7, MD-1, ECF-L, MD-2, EMMPRIN/CD147, MGL2, endoglina/CD105, osteoactivina/GPNMB, Fc- γ RI/CD64, osteopontina, Fc- γ RIIB/CD32b, PD-L2, Fc- γ RIIC/CD32c, Siglec-3/CD33, Fc- γ RIIA/CD32a, SIGNR1/CD209, Fc- γ RIIB/CD16, SLAM, GM-CSF R α , TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TLR3, IFN- γ RI, TLR4, IFN-gamma R2, TREM-1, IL-1 RII, TREM-2, ILT2/CD85j, TREM-3, ILT3/CD85k, TREML1/TLT-1, 2B4/SLAMF4, IL-10 R α , ALCAM, IL-10 R β , aminopeptidasaN/ANPEP, ILT2/CD85j, cadena β común, ILT3/CD85k, Clq R1/CD93, ILT4/CD85d, CCR1, ILT5/CD85a, CCR2, CD206, integrina α 4/CD49d, CCR5, integrina α M/CD11b, CCR8, integrina α X/CD11c, CD155/PVR, integrina β 2/CD18, CD14, integrina β 3/CD61, CD36/SR-B3, LAIR1, CD43, LAIR2, CD45, leucotrieno B4-R1, CD68, LIMP1/CD300A, CD97, LMIR2/CD300c, CD163, LMIR3/CD300LF, factor de coagulación III/factor tisular, LMIR5/CD300LB, CX3CR1, CX3CL1, LMIR6/CD300LE, CXCR4, LRP-1, CXCR6, M-CSF R, DEP-1/CD148, MD-1, DNAM-1, MD-2, EMMPRIN/CD147, MMR, endoglina/CD105, NCAM-L1, Fc- γ RI/CD64, PSGL-1, Fc- γ RIIICD16, RP105, G-CSF R, L-selectina, GM-CSF R α , Siglec-3/CD33, HVEM/TNFRSF14, SLAM, ICAM-1/CD54, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TREM-1, IL-6 R, TREM-2, CXCR1/IL-8 RA, TREM-3, o TREML1/TLT-1; y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un monocito/macrófago, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a B7-H1, CD31/PECAM-1, CD163, CCR2, o receptor de manosa de macrófago CD206 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un monocito/macrófago, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a SIRP1a y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra SIRP1a sobre células macrófagas y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 o PD-L2 sobre células tumorales.
- En diversas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un marcador de punto de control, por ejemplo, uno o más de PD-1/PD-L1 o PD-L2, CD28/CD80 o CD86, CTLA4/CD80 o CD86, ICOS/COSL o B7RP1, BTLA/HVEM, KIR, LAG3, CD137/CD137L, OX40/OX40L, CD27, CD40L, TIM3/GaI9 y A2aR. En una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un marcador de punto de control sobre un linfocito T, por ejemplo, PD-1 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral, por ejemplo, PD-L1 o PD-L2, junto con cualquiera de los IFN α 2

mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-1 sobre linfocitos T y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L1 sobre células tumorales. En otra realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-1 sobre linfocitos T y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra PD-L2 sobre células tumorales.

En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende dos o más restos de transporte dirigido que se dirigen a las mismas células inmunitarias o a células inmunitarias diferentes. En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica tiene (i) uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula inmunitaria seleccionada entre un linfocito T, un linfocito B, una célula dendrítica, un macrófago, un linfocito NK o subconjuntos de las mismas y (ii) uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra la misma célula inmunitaria u otra célula inmunitaria seleccionada entre un linfocito T, un linfocito B, una célula dendrítica, un macrófago, un linfocito NK o subconjuntos de las mismas, junto con cualquiera de los IFN- α 2 mutantes descritos en el presente documento (por ejemplo, IFN- β modificado).

En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito T y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra el mismo linfocito T o contra otro linfocito T. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito T y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito T y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un linfocito T y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un linfocito T y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK. Por ejemplo, en una realización ilustrativa, la proteína quimérica puede incluir un resto de transporte dirigido contra CD8 y un resto de transporte dirigido contra Clec9A. En otra realización ilustrativa, la proteína quimérica puede incluir un resto de transporte dirigido contra CD8 y un resto de transporte dirigido contra CD3. En otra realización ilustrativa, la proteína quimérica puede incluir un resto de transporte dirigido contra CD8 y un resto de transporte dirigido contra PD-1.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra el mismo linfocito B o contra otro linfocito B distinto. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito T. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un linfocito B y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un linfocito B y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra la misma célula dendrítica o contra otra célula dendrítica distinta. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito T. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra una célula dendrítica y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra una célula dendrítica y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra el mismo macrófago o contra otro macrófago distinto. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito T. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un macrófago y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un macrófago y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra el mismo linfocito NK o contra otro linfocito NK distinto. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito

T. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito NK y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un linfocito B. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un linfocito NK y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra un macrófago. En una realización, la presente proteína quimérica comprende uno o más restos de transporte dirigido contra un linfocito NK y uno o más restos de transporte dirigido que se dirigen contra una célula dendrítica.

En una realización, la presente proteína quimérica comprende un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral y un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra la misma célula tumoral o una célula tumoral diferente. En tales realizaciones, los restos de transporte dirigido pueden unirse a cualquiera de los antígenos tumorales descritos en el presente documento.

En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido de la invención puede comprender una secuencia que tiene una o más mutaciones de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias divulgadas en el presente documento. En diversas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende una secuencia que tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 o más mutaciones de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de restos de transporte dirigido divulgadas en el presente documento. En algunas realizaciones, dichas una o más mutaciones de aminoácidos pueden seleccionarse independientemente entre sustituciones, inserciones, deleciones y truncamientos.

En algunas realizaciones, las mutaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos, y pueden incluir sustituciones conservadoras y/o no conservadoras.

Las "sustituciones conservadoras" pueden realizarse, por ejemplo, con respecto a la similitud en polaridad, carga, tamaño, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos de aminoácidos implicados. Los 20 aminoácidos naturales pueden agruparse en los siguientes seis grupos de aminoácidos convencionales: (1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Tal como se utilizan en el presente documento, las "sustituciones conservadoras" se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido listado dentro del mismo grupo de los seis grupos de aminoácidos convencionales mostrados anteriormente. Por ejemplo, el intercambio de Asp por Glu conserva una carga negativa en el polipéptido así modificado. Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse entre sí en función de su capacidad para interrumpir las α -hélices.

Tal como se utilizan en el presente documento, las "sustituciones no conservadoras" se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido enumerado en un grupo diferente de los seis grupos de aminoácidos convencionales (1) a (6) mostrados anteriormente.

En diversas realizaciones, las sustituciones también pueden incluir aminoácidos no clásicos (por ejemplo, selenocisteína, pirrolisina, N-formilmetionina, β -alanina, GABA y ácido δ -aminolevulínico, ácido 4-aminobenzoico (PABA), D-isómeros de los aminoácidos habituales, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño, tales como β -metilaminoácidos, C α -metilaminoácidos, N α -metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general).

En diversas realizaciones, la mutación de aminoácidos puede estar en las CDR del resto de transporte dirigido (por ejemplo, las regiones CDR1, CDR2 o CDR3). En otra realización, la alteración de los aminoácidos puede producirse en las regiones marco (FR) del resto de transporte dirigido (por ejemplo, las regiones FR1, FR2, FR3 o FR4).

La modificación de las secuencias de aminoácidos puede lograrse utilizando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis basada en PCR. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989; y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1989.

Formatos de restos de transporte dirigido

El resto de transporte dirigido de la presente proteína quimérica es un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo recombinante de cadena pesada (VHH), un anticuerpo monocatenario (scFv) o un anticuerpo de cadena pesada de tiburón (VNAR).

En una realización, el resto de transporte dirigido comprende un anticuerpo de dominio único, tal como VHH procedente, por ejemplo, de un organismo que produce anticuerpos VHH, tal como un camélido, un tiburón, o un VHH diseñado. Los VHH son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales distintivas de los anticuerpos de cadena pesada naturales. La tecnología VHH se basa en anticuerpos totalmente funcionales de camélidos que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen

un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Los VHH se comercializan con la marca NANOBODIES.

En algunas realizaciones, el VHH es un VHH humanizado o un VHH camelizado.

5 En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento de la presente proteína quimérica modula funcionalmente (por ejemplo, neutraliza parcial o completamente) el antígeno o receptor diana de interés, por ejemplo, inhibiendo, reduciendo o neutralizando sustancialmente un efecto biológico que tiene el antígeno. Por ejemplo, varios dominios de reconocimiento pueden dirigirse contra uno o más antígenos tumorales que estén suprimiendo activamente, o tengan la capacidad de suprimir, el sistema inmunitario, por ejemplo, de un paciente portador de un tumor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente proteína quimérica modula funcionalmente señales inhibidoras inmunitarias (por ejemplo, inhibidores de puntos de control), por ejemplo, uno o más de TIM-3, BTLA, PD-1, CTLA-4, B7-H4, GITR, 10 galectina-9, HVEM, PD-L1, PD-L2, B7-H3, CD244, CD160, TIGIT, SIRPα, ICOS, CD172a y TMIGD2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente proteína quimérica está diseñada para interrumpir, bloquear, reducir y/o inhibir la transmisión de una señal inhibidora inmunitaria, por ejemplo, entre otros, la unión de PD-1 con PD-L1 o PD-L2 y/o la unión de CTLA-4 con uno o más de AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 y PPP2R5A.

15 En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento de la presente proteína quimérica se une, pero no modula funcionalmente, al antígeno diana o receptor de interés, por ejemplo, el dominio de reconocimiento es un anticuerpo de unión o es similar al mismo. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento simplemente se dirige al antígeno o receptor, pero no inhibe, reduce o modula funcionalmente de forma sustancial un efecto biológico que tiene el antígeno o receptor. Por ejemplo, algunos de los formatos de anticuerpos más pequeños descritos 20 anteriormente (en comparación, por ejemplo, con los anticuerpos completos) tienen la capacidad de dirigirse a epítomos de difícil acceso y proporcionar un mayor espectro de lugares de unión específicos. En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento se une a un epítipo que está físicamente separado de un antígeno o sitio receptor que es importante para su actividad biológica (por ejemplo, el sitio activo del antígeno).

25 Dicha unión no neutralizante puede utilizarse en diversas realizaciones de la presente invención, incluidos procedimientos en los que la presente proteína quimérica se utiliza para reclutar directa o indirectamente células inmunitarias activas a un sitio que las necesita a través de un antígeno efector, tal como cualquiera de los descritos en el presente documento. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la presente proteína quimérica puede utilizarse para reclutar directa o indirectamente linfocitos T citotóxicos a través de CD8 a una célula tumoral en un procedimiento de reducción o eliminación de un tumor (por ejemplo, la proteína quimérica puede comprender un dominio de reconocimiento anti-CD8 y un dominio de reconocimiento dirigido contra un antígeno tumoral). En tales realizaciones, es deseable reclutar directa o indirectamente linfocitos T citotóxicos que expresen CD8, pero no modular funcionalmente la actividad CD8. Por el contrario, en estas realizaciones, la señalización CD8 es una pieza importante del efecto reductor o eliminador del tumor. A modo de ejemplo adicional, en diversos procedimientos de reducción o eliminación de tumores, la presente proteína quimérica se utiliza para reclutar directa o indirectamente células 30 dendríticas (CD) a través de CLEC9A (por ejemplo, la proteína quimérica puede comprender un dominio de reconocimiento anti-CLEC9A y un dominio de reconocimiento dirigido contra un antígeno tumoral). En tales realizaciones, es deseable reclutar directa o indirectamente CD que expresen CLEC9A, pero no modular funcionalmente la actividad de CLEC9A. Por el contrario, en estas realizaciones, la señalización CLEC9A es una pieza importante del efecto reductor o eliminador del tumor.

40 En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento de la presente proteína quimérica se une a XCR1, por ejemplo, sobre células dendríticas. Por ejemplo, el dominio de reconocimiento, en algunas realizaciones comprende todo o parte de XCL1 o un agente anti-XCR1 no neutralizante.

45 En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento de la presente proteína quimérica se une a un antígeno inmunomodulador (por ejemplo, inmunoestimulador o inmunoinhibidor). En diversas realizaciones, el antígeno inmunomodulador es uno o más de 4-1BB, OX-40, HVEM, GITR, CD27, CD28, CD30, CD40, ligando ICOS; ligando OX-40, LIGHT (CD258), ligando GITR, CD70, B7-1, B7-2, ligando CD30, ligando CD40, ICOS, ligando ICOS, ligando CD137 y TL1A. En diversas realizaciones, dichos antígenos inmunoestimuladores se expresan sobre una célula tumoral. En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento de la presente proteína quimérica se une, pero no modula funcionalmente, a dichos antígenos inmunoestimuladores y, por lo tanto, permite el reclutamiento de células 50 que expresan estos antígenos sin la reducción o pérdida de su capacidad potencial de reducción o eliminación de tumores.

55 En diversas realizaciones, el dominio de reconocimiento de la presente proteína quimérica puede estar en el contexto de una proteína quimérica que comprende dos dominios de reconocimiento que tienen actividad neutralizante, o comprende dos dominios de reconocimiento que tienen actividad no neutralizante (por ejemplo, de unión), o comprende un dominio de reconocimiento que tiene actividad neutralizante y un dominio de reconocimiento que tiene actividad no neutralizante (por ejemplo, de unión).

Agentes señalizadores

La presente invención proporciona una proteína quimérica que incluye un IFN α 2 que se modifica para tener afinidad o actividad reducida por uno o más de sus receptores, lo que permite atenuar la actividad (incluido el agonismo o antagonismo) y/o evitar la señalización no específica o el secuestro indeseable de la proteína quimérica.

5 La afinidad o actividad reducida en el receptor puede ser restaurada mediante la unión con uno o más de los restos de transporte dirigido.

10 Las proteínas quiméricas de la presente invención reducen los efectos inespecíficos porque su IFN α 2 tiene mutaciones que debilitan o anulan la actividad o afinidad de unión en un receptor. En diversas realizaciones, esta reducción de los efectos secundarios se observa en relación con, por ejemplo, el IFN α 2 de tipo salvaje. El IFN α 2 es activo en las células diana porque el resto o restos de transporte dirigido compensan la falta/insuficiencia de unión (por ejemplo, sin limitación y/o avidez) necesaria para una activación sustancial. En diversas realizaciones, el IFN α 2 modificado es sustancialmente inactivo mientras se está dirigiendo al sitio de la actividad terapéutica y tiene su efecto sustancialmente en tipos celulares específicamente seleccionados, lo que reduce en gran medida los efectos secundarios no deseados.

15 En algunas realizaciones, el IFN α 2 puede incluir una o más mutaciones que atenúan o reducen la unión o afinidad por un receptor (es decir, un receptor terapéutico) y una o más mutaciones que reducen sustancialmente o anulan la unión o actividad en un segundo receptor. En tales realizaciones, estas mutaciones pueden estar en la misma posición o en posiciones diferentes (es decir, la misma mutación o múltiples mutaciones). En algunas realizaciones, la mutación o mutaciones que reducen la unión y/o la actividad en un receptor son diferentes de la mutación o mutaciones que las reducen sustancialmente o anulan en otro receptor. En algunas realizaciones, la mutación o mutaciones que reducen la unión y/o la actividad en un receptor son las mismas que la mutación o mutaciones que las reducen sustancialmente o anulan en otro receptor. En algunas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas tienen un IFN α 2 modificado que tiene tanto mutaciones que atenúan la unión y/o la actividad en un receptor terapéutico y, por lo tanto, permiten un efecto terapéutico más controlado y dirigido (por ejemplo, en relación con el agente de señalización de tipo salvaje), como mutaciones que reducen sustancialmente o anulan la unión y/o la actividad en otro receptor y, por lo tanto, reducen los efectos secundarios (por ejemplo, en relación con el agente de señalización de tipo salvaje).

20 La reducción sustancial o la anulación de la unión o la actividad puede ser restaurada con un resto de transporte dirigido. En diversas realizaciones, la reducción sustancial o la anulación de la unión o la actividad de un segundo receptor también puede prevenir los efectos nocivos mediados por el otro receptor. Como alternativa, o además, la reducción sustancial o la anulación de la unión o la actividad en el otro receptor hace que mejore el efecto terapéutico, ya que se reduce o elimina el secuestro de las proteínas quiméricas terapéuticas del lugar de la acción terapéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, esto obvia la necesidad de altas dosis de las presentes proteínas quiméricas que compensan la pérdida en el otro receptor. Esta posibilidad de reducir aún más la dosis reduce la probabilidad de efectos secundarios.

30 El IFN α 2 modificado comprende una o más mutaciones que hacen que el IFN α 2 tenga afinidad reducida, sustancialmente reducida o anulada, por ejemplo, unión (por ejemplo, K_D) y/o activación (por ejemplo, cuando el IFN α 2 modificado es un agonista de su receptor, que puede medirse, por ejemplo, con K_A y/o CE_{50}) y/o inhibición (por ejemplo, cuando el IFN α 2 modificado es un antagonista de su receptor, que puede medirse, por ejemplo, con K_i y/o CI_{50}), por uno o más de sus receptores. En diversas realizaciones, la afinidad reducida en el receptor del agente inmunomodulador permite atenuar la actividad (incluido el agonismo o el antagonismo). En tales realizaciones, el IFN α 2 modificado tiene aproximadamente un 1 %, o aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 10 %-20 %, aproximadamente un 20 %-40 %, aproximadamente un 40 %-60 %, aproximadamente un 60 %-80 %, aproximadamente un 80 %-100 % de la afinidad por el receptor en relación con el IFN α 2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es al menos aproximadamente 2 veces menor, aproximadamente 3 veces menor, aproximadamente 4 veces menor, aproximadamente 5 veces menor, aproximadamente 6 veces menor, aproximadamente 7 veces menor, aproximadamente 8 veces menor, aproximadamente 9 veces menor, al menos aproximadamente 10 veces menor, al menos aproximadamente 15 veces menor, al menos aproximadamente 20 veces menor, al menos aproximadamente 25 veces menor, al menos aproximadamente 30 veces menor, al menos aproximadamente 35 veces menor, al menos aproximadamente 40 veces menor, al menos aproximadamente 45 veces menor, al menos aproximadamente 50 veces menor, al menos aproximadamente 100 veces menor, al menos aproximadamente 150 veces menor, o al menos aproximadamente 10-50 veces menor, al menos aproximadamente 50-100 veces menor, al menos aproximadamente 100-150 veces menor, al menos aproximadamente 150-200 veces menor, o más de 200 veces menor en relación con el IFN α 2 de tipo salvaje.

50 En las realizaciones en las que la proteína quimérica tiene mutaciones que reducen la unión a un receptor y reducen sustancialmente o anulan la unión a un segundo receptor, la atenuación o reducción de la afinidad de unión de un IFN α 2 modificado para un receptor es menor que la reducción sustancial o anulación de la afinidad para el otro receptor. En algunas realizaciones, la atenuación o reducción de la afinidad de unión de un IFN α 2 modificado por un

- receptor es menor que la reducción sustancial o anulación de la afinidad por el otro receptor en aproximadamente un 1 %, o aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 95 %. En diversas realizaciones, la reducción sustancial o anulación se refiere a una mayor reducción de la afinidad y/o actividad de unión que la atenuación o reducción.
- En diversas realizaciones, el IFN α 2 modificado comprende una o más mutaciones que reducen la actividad endógena del agente de señalización a aproximadamente un 75%, o aproximadamente un 70%, o aproximadamente un 60%, o aproximadamente un 50%, o aproximadamente un 40%, o aproximadamente un 30%, o aproximadamente un 25%, o aproximadamente un 20%, o aproximadamente un 10%, o aproximadamente un 5%, o aproximadamente un 3%, o aproximadamente un 1%, por ejemplo, en relación con el agente de señalización de tipo salvaje
- En diversas realizaciones, el IFN α 2 modificado comprende una o más mutaciones que causan que el agente de señalización tenga afinidad y/o actividad reducida para un receptor de cualquiera de las citocinas, factores de crecimiento y hormonas como se describen en el presente documento.
- En algunas realizaciones, el IFN α 2 modificado comprende una o más mutaciones que hacen que el agente de señalización tenga una afinidad reducida por su receptor que es inferior a la afinidad de unión del resto o restos de transporte dirigido por su receptor o receptores. En algunas realizaciones, este diferencial de afinidad de unión es entre el IFN α 2/receptor y el resto de transporte dirigido/receptor sobre la misma célula. En algunas realizaciones, este diferencial de afinidad de unión permite que el IFN α 2 mutado tenga efectos específicos localizados y minimice los efectos inespecíficos que subyacen a los efectos secundarios que se observan con el IFN α 2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, esta afinidad de unión es de al menos aproximadamente 2 veces, o al menos aproximadamente 5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos aproximadamente 25 veces, o al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces, o al menos aproximadamente 150 veces.
- La actividad de unión al receptor puede medirse utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la afinidad y/o la actividad de unión pueden evaluarse mediante el análisis del diagrama de Scatchard y el ajuste informático de los datos de unión (por ejemplo, Scatchard, 1949) o mediante espectroscopia de interferencia reflectométrica en condiciones de flujo continuo, como describen Brecht *et al.* (1993).
- La secuencia de aminoácidos del IFN α 2 humano de tipo salvaje es bien conocida en la técnica. Por consiguiente, en diversas realizaciones, el IFN α 2 modificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 96%, o al menos aproximadamente un 97%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje conocida del IFN α 2 humano (por ejemplo, tiene aproximadamente un 95%, o aproximadamente un 96%, o aproximadamente un 97%, o aproximadamente un 98%, o aproximadamente un 99% de identidad de secuencia).
- El IFN α 2 modificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más mutaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, dichas una o más mutaciones de aminoácidos pueden seleccionarse independientemente entre sustituciones, inserciones, deleciones y truncamientos.
- En algunas realizaciones, las mutaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos, y pueden incluir sustituciones conservadoras y/o no conservadoras como se describe en otro punto del presente documento.
- El IFN α 2 modificado porta mutaciones que reducen sustancialmente o anulan la afinidad y/o actividad en un receptor, por ejemplo, un receptor a través del cual no está mediado un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, como resultado de la promiscuidad de unión). Los receptores de cualquier IFN α 2 modificado son conocidos en la técnica.
- Algunas mutaciones ilustrativas que proporcionan una afinidad y/o actividad reducida (por ejemplo, agonista) en un receptor se encuentran en el documento WO 2013/107791 con respecto a los interferones.
- El IFN- α 2 modificado tiene afinidad y/o actividad reducida por el receptor IFN- α / β (IFNAR), es decir, las cadenas IFNAR1 y/o IFNAR2. En algunas realizaciones, el IFN- α 2 modificado tiene una afinidad y/o actividad sustancialmente reducida o anulada por el receptor IFN- α / β (IFNAR), es decir, las cadenas IFNAR1 y/o IFNAR2.
- Las formas mutantes del interferón α son conocidas por el experto en la materia. En una realización ilustrativa, el agente de señalización modificado es la forma alélica IFN- α 2a que tiene la secuencia de aminoácidos de:

IFN- α 2a (SEQ ID NO: 336):

CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLH
EMIQQIFNLFSTKSSAAWDETLDDKFTYELYQQINDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

En una realización ilustrativa, el agente de señalización modificado es la forma alélica IFN- α 2b que tiene la secuencia de aminoácidos (que difiere de IFN- α 2a en la posición de aminoácido 23) de:

IFN- α 2b (SEQ ID NO: 337):

CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLH
EMIQQIFNLFSTKSSAAWDETLDDKFTYELYQQINDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

- 5 Dicho mutante de IFN- α 2 (IFN- α 2a o IFN- α 2b) está mutado en uno o más aminoácidos en las posiciones 144-154, tales como las posiciones de aminoácidos 148, 149 y/o 153. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 comprende una o más mutaciones seleccionadas entre L153A, R149A y M148A. Tales mutantes se describen, por ejemplo, en el documento WO2013/107791 y Piehler *et al.* (2000), J. Biol. Chem., 275:40425-40433.
- 10 En algunas realizaciones, los mutantes IFN- α 2 tienen afinidad y/o actividad reducidas para IFNAR1. En algunas realizaciones, el mutante de IFN- α 2 comprende una o más mutaciones seleccionadas entre F64A, N65A, T69A, L80A, Y85A e Y89A, como se describe en el documento WO2010/030671.
En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 comprende una o más mutaciones seleccionadas de K133A, R144A, R149A y L153A como se describe en el documento WO2008/124086.
- 15 En algunas realizaciones, el mutante de IFN- α 2 comprende una o más mutaciones seleccionadas entre R120E y R120E/K121E, como se describe en los documentos WO2015/007520 y WO2010/030671. En tales realizaciones, dicho mutante IFN- α 2 antagoniza la actividad IFN- α 2 de tipo salvaje. En tales realizaciones, dicho IFN- α 2 mutante tiene afinidad y/o actividad reducidas para IFNAR1 mientras que se conserva la afinidad y/o actividad de IFNR2.
- 20 En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende (1) una o más mutaciones seleccionadas de R120E y R120E/K121E, que, sin pretender quedar limitado por teoría alguna, crean un efecto antagonista y (2) una o más mutaciones seleccionadas de K133A, R144A, R149A, y L153A, que, sin pretender quedar limitado por teoría alguna, permiten un efecto atenuado, por ejemplo, en IFNAR2. En una realización, el mutante IFN- α 2 humano comprende R120E y L153A.
- 25 En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende una o más mutaciones seleccionadas de, L15A, A19W, R22A, R23A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33K, R33A, R33Q, H34A, D35A, Q40A, D114R, L117A, R120A, R125A, K134A, R144A, A145G, A145M, M148A, R149A, S152A, L153A, y N156A como se divulga en el documento WO 2013/059885. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende las mutaciones H57Y, E58N, Q61S, y/o L30A como se divulga en el documento WO 2013/059885. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende las mutaciones H57Y, E58N, Q61S, y/o R33A como se divulga en el documento WO 2013/059885. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende las mutaciones H57Y, E58N, Q61S, y/o M148A como se divulga en el documento WO 2013/059885. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende las mutaciones H57Y, E58N, Q61S, y/o L153A como se divulga en el documento WO 2013/059885. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende las mutaciones N65A, L80A, Y85A, y/o Y89A como se divulga en el documento WO 2013/059885. En algunas realizaciones, el mutante IFN- α 2 humano comprende las mutaciones N65A, L80A, Y85A, Y89A, y/o D114A como se divulga en el documento WO 2013/059885.
- 35 A modo de ejemplo no limitante, en una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito T, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a uno de CD8, CD4 y CD3 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral (por ejemplo, mediado por el transporte dirigido, entre otros, a un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2), junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene
- 40 un resto de transporte dirigido que se dirige contra CD8 sobre linfocitos T, un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2, sobre células tumorales, y un mutante IFN α 2 como se describe en el presente documento.
- 45 A modo de ejemplo no limitante, en una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito B, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a CD20 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral (por ejemplo, mediado por el transporte dirigido, entre otros, a un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2), junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.

- 5 A modo de ejemplo no limitante, en una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula dendrítica, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a uno de CLEC9A, XCR1 y RANK y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral (por ejemplo, mediado por el transporte dirigido, entre otros, a un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2), junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes modificados descritos en el presente documento. En una realización, la presente proteína quimérica tiene un resto de transporte dirigido que se dirige contra CLEC9A sobre células dendríticas, un segundo resto de transporte dirigido que se dirige contra un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2, sobre células tumorales, y un IFN α 2 mutante como se describe en el presente documento.
- 10 A modo de ejemplo no limitante, en una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un macrófago, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a SIRP1a y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral (por ejemplo, mediado por el transporte dirigido, entre otros, a un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2), junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- 15 A modo de ejemplo no limitante, en una realización, la presente proteína quimérica tiene (i) un resto de transporte dirigido que se dirige contra un linfocito NK, por ejemplo, mediado por el transporte dirigido a TIGIT o KIR1 y (ii) un resto de transporte dirigido que se dirige contra una célula tumoral (por ejemplo, mediado por el transporte dirigido, entre otros, a un inhibidor de punto de control, por ejemplo, entre otros, PD-L1 o PD-L2), junto con cualquiera de los IFN α 2 mutantes descritos en el presente documento.
- Conectores*
- 20 En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende opcionalmente uno o más conectores. En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica comprende un conector que conecta el resto de transporte dirigido y el IFN α 2.
- 25 En algunas realizaciones se proporcionan vectores que codifican las presentes proteínas quiméricas conectadas en forma de una única secuencia de nucleótidos a cualquiera de los conectores descritos en el presente documento y pueden utilizarse para preparar dichas proteínas quiméricas.
- 30 En algunas realizaciones, la longitud del conector permite la unión eficiente de un resto de transporte dirigido y el IFN α 2 a sus receptores. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la longitud del conector permite la unión eficaz de uno de los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 a los receptores sobre la misma célula, así como la unión eficaz del otro resto de transporte dirigido sobre otra célula. En el presente documento se incluyen pares de células a modo de ejemplo.
- 35 En algunas realizaciones, la longitud del conector es al menos igual a la distancia mínima entre los sitios de unión de uno de los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 a los receptores sobre la misma célula. En algunas realizaciones, la longitud del conector es al menos dos veces, o tres veces, o cuatro veces, o cinco veces, o diez veces, o veinte veces, o 25 veces, o 50 veces, o cien veces o más la distancia mínima entre los sitios de unión de uno de los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 a los receptores sobre la misma célula.
- Tal como se describe en el presente documento, la longitud del conector permite la unión eficiente de uno de los restos de transporte dirigido y el IFN α 2 a los receptores sobre la misma célula, siendo la unión secuencial, por ejemplo, la unión de resto de transporte dirigido/receptor precede a la unión de IFN α 2/receptor.
- 40 En algunas realizaciones, hay dos conectores en una única quimera, cada uno de los cuales conecta el IFN α 2 a un resto de transporte dirigido. En diversas realizaciones, los conectores tienen longitudes que permiten la formación de un sitio que tiene una célula de enfermedad y una célula efectora sin impedimentos estéricos que impedirían la modulación de cualquiera de las células.
- 45 La invención contempla el uso de una diversidad de secuencias conectoras. En diversas realizaciones, el conector puede derivarse de proteínas multidominio de origen natural o ser conectores empíricos como los descritos, por ejemplo, en Chichili *et al.* (2013), Protein Sci., 22(2):153-167; Chen *et al.* (2013), Adv. Drug Deliv. Rev., 65(10):1357-1369. En algunas realizaciones, el conector puede diseñarse utilizando bases de datos de diseño de conectores y programas informáticos como los descritos en Chen *et al.* (2013), Adv. Drug Deliv. Rev., 65(10):1357-1369 y Crasto *et al.* (2000), Protein Eng., 13(5):309-312. En diversas realizaciones, el conector puede ser funcional. Por ejemplo, sin limitación, el conector puede actuar para mejorar el plegamiento y/o la estabilidad, mejorar la expresión, mejorar la farmacocinética y/o mejorar la bioactividad de la presente proteína quimérica.
- 50 En algunas realizaciones, el conector es un polipéptido. En algunas realizaciones, el conector tiene menos de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el conector puede tener una longitud de menos de aproximadamente 100, aproximadamente 95, aproximadamente 90, aproximadamente 85, aproximadamente 80, aproximadamente 75, aproximadamente 70, aproximadamente 65, aproximadamente 60, aproximadamente 55, aproximadamente 50, aproximadamente 45, aproximadamente 40, aproximadamente 35, aproximadamente 30, aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 12,

aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 aminoácidos. En algunas realizaciones, el conector es un polipéptido. En algunas realizaciones, el conector tiene una longitud superior a aproximadamente 100 aminoácidos. Por ejemplo, el conector puede tener una longitud superior a

5 aproximadamente 100, aproximadamente 95, aproximadamente 90, aproximadamente 85, aproximadamente 80, aproximadamente 75, aproximadamente 70, aproximadamente 65, aproximadamente 60, aproximadamente 55, aproximadamente 50, aproximadamente 45, aproximadamente 40, aproximadamente 35, aproximadamente 30, aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 12,

10 aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 aminoácidos. En algunas realizaciones, el conector es flexible. En otra realización, el conector es rígido.

En algunas realizaciones, un conector conecta los dos restos de transporte dirigido entre sí, y este conector tiene una longitud corta, y un conector conecta un resto de transporte dirigido e IFN α 2, y este conector es más largo que el conector que conecta los dos restos de transporte dirigido. Por ejemplo, la diferencia en la longitud de aminoácidos entre el conector que conecta las dos restos de transporte dirigido y el conector que conecta un resto de transporte dirigido e IFN α 2 puede ser de aproximadamente 100, aproximadamente 95, aproximadamente 90, aproximadamente 85, aproximadamente 80, aproximadamente 75, aproximadamente 70, aproximadamente 65, aproximadamente 60, aproximadamente 55, aproximadamente 50, aproximadamente 45, aproximadamente 40, aproximadamente 35, aproximadamente 30, aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2 aminoácidos.

En diversas realizaciones, el conector se compone sustancialmente de residuos de glicina y serina (por ejemplo, aproximadamente un 30%, o aproximadamente un 40%, o aproximadamente un 50%, o aproximadamente un 60%, o aproximadamente un 70%, o aproximadamente un 80%, o aproximadamente un 90%, o aproximadamente un 95%, o aproximadamente un 97% de glicinas y serinas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conector es (Gly $_4$ Ser) $_n$, en donde n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En una realización, la secuencia conectora es GSGSGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 352). Otros conectores ilustrativos incluyen, entre otros, conectores con la secuencia LE, GGGGS (SEQ ID NO: 353), (GGGGGS) $_n$ (n = 1-4) (SEQ ID NO: 354), (Gly) $_8$ (SEQ ID NO: 354), (Gly) $_8$ (SEQ ID NO: 356), (EAAAK) $_n$ (n = 1-3) (SEQ ID NO: 357), A(EAAAK) $_n$ A (n = 2-5) (SEQ ID NO: 358), AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO: 359), A(EAAAK) $_4$ AEAAKEAAKA (SEQ ID NO: 360), PAPAP (SEQ ID NO: 361), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 362), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 363), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 364), y (XP) $_n$, donde X indica cualquier aminoácido, por ejemplo, Ala, Lys o Glu. En diversas realizaciones, el conector es GGS.

En algunas realizaciones, el conector es una región bisagra de un anticuerpo (por ejemplo, de IgG, IgA, IgD e IgE, incluidas las subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e IgA1 e IgA2)). En diversas realizaciones, el conector es una región bisagra de un anticuerpo (por ejemplo, de IgG, IgA, IgD e IgE, incluidas las subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e IgA1 e IgA2)). La región bisagra, que se encuentra en los anticuerpos de clase IgG, IgA, IgD e IgE, actúa como un espaciador flexible, permitiendo que la porción Fab se mueva libremente en el espacio. A diferencia de las regiones constantes, los dominios bisagra son estructuralmente diversos, variando tanto en secuencia como en longitud entre las clases y subclases de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la longitud y flexibilidad de la región bisagra varía entre las subclases de IgG. La región bisagra de la IgG1 abarca los aminoácidos 216-231 y, al ser libremente flexible, los fragmentos Fab pueden girar sobre sus ejes de simetría y moverse dentro de una esfera centrada en el primero de los dos puentes disulfuro entre cadenas pesadas. La IgG2 tiene una bisagra más corta que la IgG1, con 12 residuos de aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. La región bisagra de la IgG2 carece de un residuo de glicina, es relativamente corta y contiene una doble hélice rígida de poliprolina, estabilizada por puentes disulfuro adicionales entre cadenas pesadas. Estas propiedades restringen la flexibilidad de la molécula de IgG2. La IgG3 se diferencia de las otras subclases por su exclusiva región bisagra extendida (aproximadamente cuatro veces más larga que la bisagra de la IgG1), que contiene 62 aminoácidos (incluidas 21 prolina y 11 cisteínas), formando una doble hélice de poliprolina inflexible. En la IgG3, los fragmentos Fab están relativamente alejados del fragmento Fc, lo que confiere a la molécula una mayor flexibilidad. La bisagra alargada de la IgG3 también es responsable de su mayor peso molecular en comparación con las otras subclases. La región bisagra de la IgG4 es más corta que la de la IgG1 y su flexibilidad es intermedia entre la de la IgG1 y la de la IgG2. La flexibilidad de las regiones bisagra disminuye en el siguiente orden: IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2.

Según estudios cristalográficos, la región bisagra de la inmunoglobulina puede subdividirse funcionalmente en tres regiones: la región superior de la bisagra, la región central y la región inferior de la bisagra. Véase Shin *et al.*, 1992, Immunological Reviews, 130:87. La región superior de la bisagra incluye aminoácidos desde el extremo carboxilo de C $_{H1}$ hasta el primer residuo de la bisagra que restringe el movimiento, generalmente el primer residuo de cisteína que forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. La longitud de la región superior de la bisagra se correlaciona con la flexibilidad segmentaria del anticuerpo. La región central de la bisagra contiene los puentes

disulfuro entre cadenas pesadas, y la región inferior de la bisagra se une al extremo amino terminal del dominio C_{H2} e incluye residuos en C_{H2} . *Id.* La región central de la bisagra de la IgG1 humana de tipo salvaje contiene la secuencia Cys-Pro-Pro-Cys que, cuando se dimeriza mediante la formación de enlaces disulfuro, da lugar a un octapéptido cíclico que se cree que actúa como pivote, confiriendo así flexibilidad. En diversas realizaciones, el presente conector comprende una, dos o tres de la región superior de la bisagra, la región central y la región inferior de la bisagra de cualquier anticuerpo (por ejemplo, de IgG, IgA, IgD e IgE, incluidas las subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e IgA1 e IgA2)). La región bisagra también puede contener uno o más sitios de glucosilación, que incluyen una serie de tipos estructuralmente distintos de sitios para la unión de carbohidratos. Por ejemplo, IgA1 contiene cinco sitios de glucosilación dentro de un segmento de 17 aminoácidos de la región bisagra, lo que confiere resistencia del polipéptido de la región bisagra a las proteasas intestinales, lo que se considera una propiedad ventajosa para una inmunoglobulina secretora. En diversas realizaciones, el conector de la presente invención comprende uno o más sitios de glucosilación. En diversas realizaciones, el conector es un dominio bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo IgG4 humano.

Si se desea, la presente proteína quimérica puede unirse a una región Fc de anticuerpo, que comprende uno o ambos dominios C_{H2} and C_{H3} y, opcionalmente, una región bisagra. Por ejemplo, los vectores que codifican las presentes proteínas quiméricas conectadas en forma de una única secuencia de nucleótidos a una región Fc pueden utilizarse para preparar dichos polipéptidos.

En algunas realizaciones, el conector es un conector sintético, tal como PEG.

En diversas realizaciones, el conector puede ser funcional. Por ejemplo, sin limitación, el conector puede actuar para mejorar el plegamiento y/o la estabilidad, mejorar la expresión, mejorar la farmacocinética y/o mejorar la bioactividad de la presente proteína quimérica. En otro ejemplo, el conector puede funcionar para dirigir la proteína quimérica a un tipo o localización celular concretos.

Producción de proteínas quiméricas

En el presente documento se describen procedimientos para producir las proteínas quiméricas de la invención. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican las proteínas quiméricas de la invención (por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican el IFN α 2 modificado y los restos de transporte dirigido y el conector) pueden sintetizarse químicamente utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Las secuencias de ADN sintético pueden ligarse a otras secuencias de nucleótidos apropiadas, incluidas, por ejemplo, secuencias de control de la expresión, para producir construcciones de expresión génica que codifiquen las proteínas quiméricas deseadas. Por consiguiente, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica de la invención.

Los ácidos nucleicos que codifican la proteína quimérica de la invención pueden incorporarse (ligarse) en vectores de expresión, que pueden introducirse en células hospedadoras mediante técnicas de transfección, transformación o transducción. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican la proteína quimérica de la invención pueden introducirse en las células hospedadoras mediante transducción retroviral. Algunas células hospedadoras ilustrativas son células de *E. coli*, células de ovario de hámster chino ("Chinese hamster ovary", CHO), células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y células de mieloma. Las células hospedadoras transformadas pueden cultivarse en condiciones que permitan a las células hospedadoras expresar los genes que codifican la proteína quimérica de la invención. En consecuencia, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican la proteína quimérica de la invención. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona además células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión.

Las condiciones específicas de expresión y purificación variarán en función del sistema de expresión empleado. Por ejemplo, si un gen se va a expresar en *E. coli*, en primer lugar se clona en un vector de expresión situando el gen modificado cadena abajo de un promotor bacteriano adecuado, por ejemplo, Trp o Tac, y una secuencia señal procariota. En otro ejemplo, si el gen modificado se va a expresar en células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, células CHO, en primer lugar se inserta en un vector de expresión que contenga, por ejemplo, un promotor eucariota adecuado, una señal de secreción, potenciadores y diversos intrones. La construcción genética puede introducirse en las células hospedadoras mediante técnicas de transfección, transformación o transducción.

La proteína quimérica de la invención puede producirse cultivando una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica la proteína quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína. Tras la expresión, la proteína puede recogerse y purificarse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, marcadores de afinidad, tales como glutatión-S-transferasa (GST) y marcadores de histidina o por cromatografía.

Por consiguiente, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica de la presente invención. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica de la presente invención.

Excipientes y sales farmacéuticamente aceptables

Las proteínas químicas descritas en el presente documento pueden poseer un grupo funcional suficientemente básico, que puede reaccionar con un ácido inorgánico u orgánico, o un grupo carboxilo, que puede reaccionar con una base inorgánica u orgánica, para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable se forma a partir de un ácido farmacéuticamente aceptable, como es bien conocido en la técnica. Tales sales incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas, por ejemplo, en *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) y *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*, P. H. Stahl y C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zürich (Suiza) 2002.

Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, canforsulfonato, pamoato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, benzoato de metilo, o-acetoxibenzoato, naftalen-2-benzoato, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butilen-1,4-dicarboxilato, hexin-1,4-dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, glicolato, heptanoato, hipurato, malato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, ftalato, teraftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, sebacato, suberato, p-bromobencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftalen-1-sulfonato, naftalen-2-sulfonato, naftalen-1,5-sulfonato, xilenosulfonato y tartarato.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" también se refiere a una sal de las composiciones de la presente invención que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico, y una base. Las bases adecuadas incluyen, entre otras, hidróxidos de metales alcalinos, tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos, tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y zinc; amoníaco, y aminas orgánicas, tales como mono-, di- o trialquilaminas no sustituidas o hidroxisustituidas, dicitclohexilamina; tributilamina; piridina; N-metil, N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis- o tris-(2-OH-alkilo inferior aminas), tales como mono-, bis- o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxiterc-butilamina, o tris-(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alkil-N-(hidroxilalkil)aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amina o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos, tales como arginina, lisina, y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento están en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

En diversas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas químicas descritas en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede administrarse a un sujeto como componente de una composición que comprende un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden comprender opcionalmente una cantidad adecuada de un excipiente farmacéuticamente aceptable para proporcionar la forma de administración adecuada.

En diversas realizaciones, los excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos pueden ser, por ejemplo, solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, pueden utilizarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, los excipientes farmacéuticamente aceptables son estériles cuando se administran a un sujeto. El agua es un excipiente útil cuando farmacéuticamente descrito en el presente documento se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como excipientes líquidos, específicamente para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se encuentran también el almidón, la glucosa, la lactosa, la sacarosa, la gelatina, la malta, el arroz, la harina, la creta, el gel de sílice, el estearato de sodio, el monoestearato de glicerol, el talco, el cloruro de sodio, la leche desnatada en polvo, el glicerol, el propilenglicol, el agua, el etanol y similares. Cualquier agente descrito en el presente documento, si se desea, también puede comprender pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Otros ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19ª ed., 1995).

La presente invención incluye las composiciones farmacéuticas descritas (y/o agentes terapéuticos adicionales) en diversas formulaciones. Cualquier composición farmacéutica de la invención (y/o agentes terapéuticos adicionales) descrita en el presente documento puede adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, gotas, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, cápsulas de gelatina, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones, polvo liofilizado, suspensión congelada, polvo desecado o cualquier otra forma adecuada para el uso. En una realización, la composición se presenta en forma de cápsula. En otra realización, la composición se presenta en forma de

comprimido. En otra realización, la composición farmacéutica se formula en forma de cápsula de gelatina blanda. En otra realización, la composición farmacéutica se formula en forma de cápsula de gelatina. En otra realización, la composición farmacéutica se formula en forma líquida.

5 Cuando sea necesario, las composiciones farmacéuticas de la invención (y/o agentes adicionales) también pueden incluir un agente solubilizante. Además, los agentes pueden administrarse con un vehículo o dispositivo de administración adecuado conocido en la técnica. Las terapias combinadas descritas en el presente documento pueden administrarse conjuntamente en un único vehículo o dispositivo de administración.

10 Las formulaciones que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención (y/o agentes adicionales) de la presente invención pueden presentarse convenientemente en formas farmacéuticas unitarias y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales procedimientos incluyen generalmente la etapa de poner los agentes terapéuticos en asociación con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes accesorios. Normalmente, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el agente terapéutico con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, moldeando el producto en formas farmacéuticas de la formulación deseada (por ejemplo, granulación en húmedo o en seco, mezclas de polvos, etc., seguidas de la formación de comprimidos utilizando procedimientos convencionales conocidos en la técnica).

En diversas realizaciones, cualquier composición farmacéutica (y/o agentes adicionales) descrita en el presente documento se formula de acuerdo con procedimientos habituales en forma de una composición adaptada para un modo de administración descrito en el presente documento.

20 Las vías de administración incluyen, por ejemplo, la vía oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación o tópica. La administración puede ser local o sistémica. En algunas realizaciones, la administración se efectúa por vía oral. En otra realización, la administración se realiza mediante inyección parenteral. El modo de administración puede dejarse a discreción del facultativo y depende en parte de la localización de la afección. En la mayoría de los casos, la administración da lugar a la liberación de cualquier agente descrito en el presente documento hacia el torrente sanguíneo.

30 En una realización, la proteína quimérica descrita en el presente documento se formula de acuerdo con procedimientos habituales en forma de una composición adaptada para la administración oral. Las composiciones para la administración oral pueden presentarse en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden comprender uno o más agentes, por ejemplo, edulcorantes, tales como fructosa, aspartamo o sacarina; aromatizantes, tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; colorantes y conservantes, para proporcionar un preparado farmacéuticamente apetecible. Además, cuando se presentan en forma de comprimidos o píldoras, las composiciones pueden recubrirse para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto osmóticamente activo que impulsa cualquiera de las proteínas quiméricas descritas en el presente documento también son adecuadas para composiciones administradas por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula es absorbido por el compuesto impulsor, que se hincha para desplazar el agente o la composición del agente a través de una abertura. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de administración prácticamente de orden cero, a diferencia de los perfiles con picos de las formulaciones de liberación inmediata. También puede ser útil un material de retardo, tal como el monoestearato de glicerol o el estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir excipientes convencionales, tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. En una realización, los excipientes son de calidad farmacéutica. Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isosteárilicos etoxilados, sorbitol polioxietilenado y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto, etc., y sus mezclas.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea e intraarticular) incluyen, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones y similares. También pueden fabricarse en forma de composiciones sólidas estériles (por ejemplo, composición liofilizada), que pueden disolverse o suspenderse en medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Pueden contener, por ejemplo, agentes de suspensión o dispersión conocidos en la técnica. Los componentes de la formulación adecuados para la administración parenteral incluyen un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como EDTA; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa.

60 Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato ("phosphate buffered saline", PBS). El vehículo debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe protegerse frente a los

microorganismos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento, solas o combinadas con otros componentes adecuados, pueden conformarse en formulaciones de aerosol (es decir, "nebulizadas") para ser administradas por inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden introducirse en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Cualquier composición farmacéutica de la invención (y/o agentes adicionales) descrita en el presente documento puede ser administrada por medios de liberación controlada o sostenida o por dispositivos de administración que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen, entre otros, los descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs 3 845 770; 3 916 899; 3 536 809; 3 598 123; 4 008 719; 5 674 533; 5 059 595; 5 591 767; 5 120 548; 5 073 543; 5 639 476; 5 354 556 y 5 733 556. Dichas formas farmacéuticas pueden ser útiles para proporcionar una liberación controlada o sostenida de uno o más principios activos utilizando, por ejemplo, hidropropilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones adecuadas de liberación controlada o sostenida conocidas por los expertos en la materia, incluidas las descritas en el presente documento, pueden seleccionarse con facilidad para su uso con los principios activos de los agentes descritos en el presente documento. Así pues, la invención proporciona formas farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración oral, tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel y comprimidos oblongos, adaptadas para la liberación controlada o sostenida.

La liberación controlada o sostenida de un principio activo puede ser estimulada por diversas condiciones, incluidas, entre otras, cambios en el pH, cambios en la temperatura, estimulación por una longitud de onda apropiada de luz, concentración o disponibilidad de enzimas, concentración o disponibilidad de agua, u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

En otra realización, un sistema de liberación controlada puede situarse en las proximidades de la zona diana a tratar, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Pueden usarse otros sistemas de liberación controlada analizados en el artículo de Langer, 1990, *Science*, 249:1527-1533).

Las formulaciones farmacéuticas son preferentemente estériles. La esterilización puede realizarse, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización por filtración puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución.

Administración y posología

Se apreciará que la dosis real de la proteína quimérica que se va a administrar según la presente invención variará en función de la forma farmacéutica concreta y el modo de administración. Los expertos en la materia pueden tener en cuenta muchos factores que pueden modificar la acción de la proteína quimérica (por ejemplo, el peso corporal, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, el estado del sujeto, las combinaciones de fármacos, la disposición genética y las sensibilidades a las reacciones). La administración puede realizarse de forma continua o en una o más dosis discretas dentro de la dosis máxima tolerada. Los expertos en la materia pueden determinar las tasas de administración óptimas para un conjunto determinado de condiciones mediante pruebas convencionales de administración de dosis.

En algunas realizaciones, una dosis adecuada de la proteína quimérica está en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 g/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 g/kg de peso corporal, aproximadamente 10 g/kg de peso corporal, incluidos todos los valores e intervalos intermedios.

Las dosis individuales de la proteína quimérica pueden administrarse en formas farmacéuticas unitarias (por ejemplo, comprimidos o cápsulas) que contengan, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 75 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 g, de

aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 25 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 7,5 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2,5 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 g, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg de principio activo, de aproximadamente 0,1 mg aproximadamente unos 30 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg por unidad de dosificación, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg por forma farmacéutica unitaria. Por ejemplo, una forma farmacéutica unitaria puede ser de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,02 mg, aproximadamente 0,03 mg, aproximadamente 0,04 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,06 mg, aproximadamente 0,07 mg, aproximadamente 0,08 mg, aproximadamente 0,09 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 1 g, aproximadamente 2,5 g, aproximadamente 5 g, aproximadamente 10 g, aproximadamente 25 g, aproximadamente 50 g, aproximadamente 75 g, aproximadamente 100 g, incluidos todos los valores e intervalos intermedios.

En una realización, la proteína quimérica se administra en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 75 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 25 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 7,5 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2,5 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 g diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 95 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 85 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 80 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 75 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 70 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 65 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 55 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 45 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 35 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 25 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 15 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg diarios, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg diarios, En diversas realizaciones, la proteína quimérica se administra a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,02 mg, aproximadamente 0,03 mg, aproximadamente 0,04 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,06 mg, aproximadamente 0,07 mg, aproximadamente 0,08 mg, aproximadamente 0,09 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 1 g, aproximadamente 2,5 g, aproximadamente 5 g, aproximadamente 7,5 g, aproximadamente 10 g, aproximadamente 25 g, aproximadamente 50 g, aproximadamente 75 g, aproximadamente 100 g, incluidos todos los valores e intervalos intermedios.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica puede administrarse, por ejemplo, más de una vez al día (por ejemplo, aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cuatro veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente seis

veces, aproximadamente siete veces, aproximadamente ocho veces, aproximadamente nueve veces o aproximadamente diez veces al día), aproximadamente una vez al día, aproximadamente cada dos días, aproximadamente cada tres días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada dos meses, aproximadamente una vez cada tres meses, aproximadamente una vez cada seis meses o aproximadamente una vez al año.

Terapia combinada y agentes terapéuticos adicionales (no forman parte de la invención)

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención se coadministra junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La coadministración puede ser simultánea o secuencial.

En una realización, el agente terapéutico adicional y la proteína quimérica de la presente invención se administran a un sujeto simultáneamente. El término "simultáneamente", tal como se utiliza en el presente documento, significa que el agente terapéutico adicional y la proteína quimérica se administran con una separación temporal de no más de aproximadamente 60 minutos, como no más de aproximadamente 30 minutos, no más de aproximadamente 20 minutos, no más de aproximadamente 10 minutos, no más de aproximadamente 5 minutos o no más de aproximadamente 1 minuto. La administración del agente terapéutico adicional y de la proteína quimérica puede realizarse mediante la administración simultánea de una única formulación (por ejemplo, una formulación que incluya el agente terapéutico adicional y la proteína quimérica) o de formulaciones distintas (por ejemplo, una primera formulación que incluya el agente terapéutico adicional y una segunda formulación que incluya la proteína quimérica).

La coadministración no requiere que los agentes terapéuticos se administren simultáneamente, si el momento de su administración es tal que las actividades farmacológicas del agente terapéutico adicional y la proteína quimérica se superponen en el tiempo, ejerciendo así un efecto terapéutico combinado. Por ejemplo, el agente terapéutico adicional y la proteína quimérica pueden administrarse secuencialmente. El término "secuencialmente", tal como se utiliza en el presente documento, significa que el agente terapéutico adicional y la proteína quimérica se administran con una separación temporal de más de aproximadamente 60 minutos. Por ejemplo, el tiempo entre la administración secuencial del agente terapéutico adicional y la proteína quimérica puede ser de más de aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 2 horas, más de aproximadamente 5 horas, más de aproximadamente 10 horas, más de aproximadamente 1 día, más de aproximadamente 2 días, más de aproximadamente 3 días, más de aproximadamente 1 semana, más de aproximadamente 2 semanas o más de aproximadamente un mes. Los tiempos óptimos de administración dependerán de las tasas de metabolismo, excreción y/o de la actividad farmacodinámica del agente terapéutico adicional y de la proteína quimérica administrada. Puede administrarse primero el agente terapéutico adicional o la célula proteica quimérica.

La coadministración tampoco requiere que los agentes terapéuticos se administren al sujeto por la misma vía de administración. Más bien, cada agente terapéutico puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, parenteral o no parenteral.

En algunas realizaciones, la proteína quimérica descrita en el presente documento actúa sinérgicamente cuando se coadministra con otro agente terapéutico. En tales realizaciones, la proteína quimérica y el agente terapéutico adicional pueden administrarse a dosis inferiores a las empleadas cuando los agentes se utilizan en el contexto de una monoterapia.

En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos son agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, sin limitación, dicha combinación de las presentes proteínas quiméricas y agente quimioterapéutico pueden usarse en el tratamiento de cánceres, como se describe en otro punto del presente documento. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN; alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouana, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, tales como alretamina, trietilenmelamina, fotemustina, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (por ejemplo, bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (por ejemplo, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CB 1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clorafanfazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall y caliqueamicina omegall (véase, por ejemplo, Agnew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluida la dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos de enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA doxorubicina (incluida la morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-

fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteroptera, trimetrexato; análogos de las purinas, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de las pirimidinas, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales, tales como minoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (por ejemplo, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE formulación de paclitaxel en nanopartículas sin Cremophor y modificado con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.), y TAXOTERE doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; GEMZAR gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluido el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluido el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); lapatinib (Tykerb); inhibidores de PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Además, los procedimientos de tratamiento pueden incluir el uso de radiación. Además, los procedimientos de tratamiento pueden incluir el uso de terapia fotodinámica.

En algunas realizaciones, las quimeras biespecíficas presentes se combinan con el ligando 3 de tirosina cinasa similar a FMS (FLT3L), por ejemplo, la quimera biespecífica VHH anti-Clec9a humano/VHH anti-PDL1 humano/IFN humano-R149A puede combinarse con FLT3L.

En algunas realizaciones, incluidas, entre otras, las aplicaciones para enfermedades infecciosas, los antiinfecciosos son agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, el antiinfeccioso es un agente antivírico que incluye, entre otros, abacavir, aciclovir, adefovir, amprenavir, atazanavir, cidofovir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, efavirenz, elvitegravir, emtricitabina, enfuvirtida, etravirina, famciclovir y foscarnet. En algunas realizaciones, el antiinfeccioso es un agente antibacteriano que incluye, entre otros, antibióticos de cefalosporina (cefalexina, cefuroxima, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo y ceftobiprol); antibióticos de fluoroquinolona (cipro, Levaquin, floxina, tequin, avelox y norflox); antibióticos de tetraciclina (tetraciclina, minociclina, oxitetraciclina y doxiciclina); antibióticos de penicilina (amoxicilina, ampicilina, penicilina V, dicloxacilina, carbenicilina, vancomicina y meticilina); antibióticos monobactámicos (aztreonam); y antibióticos carbapenémicos (ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina y meropenem). En algunas realizaciones, los antiinfecciosos incluyen agentes antipalúdicos (por ejemplo, cloroquina, quinina, primaquina, doxiciclina, artemetero/lumefantrina, atovuacuna/proguanil y sulfadoxina/pirimetamina), metronidazol, tinidazol, ivermectina, pamoato de pirantel y albendazol.

En algunas realizaciones, incluidas, entre otras, las aplicaciones autoinmunitarias, el agente terapéutico adicional es un agente inmunosupresor. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor es un agente antiinflamatorio, tal como un agente antiinflamatorio esteroideo o un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Los esteroides, en especial los corticoesteroides suprarrenales y sus análogos sintéticos, son bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de corticoesteroides útiles en la presente invención incluyen, entre otros, hidroxiltriamicinolona, alfa-metilbetametasona, beta-metilbetametasona, dipropionato de beclometasona, benzoato de betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, dexametasona, diacetato de diflurasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de fluclorolona, pivalato de flumetasona, acetónido de flusinolona, fluciclonida, butilester de flucortona, flucortolona, acetato de fluprednidenol (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorosona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el resto de sus ésteres, cloroprednisona, clocortelona, clesciclonolona, diclorisona, difluprednato, fluclorolona, flunisolido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, hidrocortisona, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona. Los AINE que pueden utilizarse en la presente invención, incluyen, entre otros, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, salicilato de metilo, salicilato de glicol, salicilmidas, ácido bencil-2,5-diacetoxibenzoico, ibuprofeno, fulindaco, naproxeno, ketoprofeno, etofenamato, fenilbutazona e indometacina. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor puede ser un citostático, tales como agentes alquilantes, antimetabolitos (por ejemplo, azatioprina, metotrexato), antibióticos citotóxicos, anticuerpos (por ejemplo, basiliximab, daclizumab y muromonab), antiinmunofilinas (por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus), interferones, opioides, proteínas de unión al TNF, micofenolatos y agentes biológicos pequeños (por ejemplo, fingolimod, miriocina). Otros agentes antiinflamatorios se describen, por ejemplo, en la patente de EE. U. n.º 4 537 776.

Se divulgan diversos agentes utilizados para tratar la obesidad como agentes terapéuticos adicionales. Entre los agentes ilustrativos utilizados para tratar la obesidad se incluyen, entre otros, orlistat (por ejemplo, ALL1, XENICAL), loracaserina (por ejemplo, BELVIQ), fentermina-topiramato (por ejemplo, QSYMIA), sibutramina (por ejemplo, REDUCTIL o MERJIDIA), rimonabant (ACOMPLLA), exenatida (por ejemplo, BYETTA), pramlintida (por ejemplo, SYMLIN), fentermina, benzfetamina, dietilpropión, fendimetrazmo, bupropión y metformina. Entre los agentes adicionales se encuentran los que interfieren en la capacidad del organismo para absorber nutrientes específicos de los alimentos, tales como orlistat (por ejemplo, ALU, XENICAL), el glucomanano y la goma guar. Los agentes que suprimen el apetito también se encuentran entre los agentes adicionales, por ejemplo, las catecolaminas y sus derivados (tales como la fenteimina y otros fármacos basados en la anfetamina), diversos antidepresivos y estabilizadores del estado de ánimo (por ejemplo, bupropión y topiramato), anorexígenos (por ejemplo, dexedrina, digoxina). Entre los agentes adicionales también se encuentran los que aumentan el metabolismo del organismo.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse entre supresores del apetito, inhibidores de la recaptación de neurotransmisores, agonistas dopaminérgicos, agonistas serotoninérgicos, moduladores de la señalización GABAérgica, anticonvulsivos, antidepresivos, inhibidores de la monoaminoxidasa, antagonistas del receptor de la sustancia P (NK1), agonistas y antagonistas de los receptores de melanocortina, inhibidores de la lipasa, inhibidores de la absorción de grasas, reguladores de la ingesta de energía o del metabolismo, moduladores de los receptores de cannabinoides, agentes para el tratamiento de la adicción, agentes para el tratamiento del síndrome metabólico, moduladores de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas ("peroxisome proliferator-activated receptor", PPAR); antagonistas de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), agentes para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, agentes para el tratamiento de niveles elevados de triglicéridos, agentes para el tratamiento de niveles bajos de HDL, agentes para el tratamiento de la hipercolesterolemia y agentes para el tratamiento de la hipertensión. Algunos agentes para enfermedades cardiovasculares incluyen estatinas (por ejemplo, lovastatina, atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina, simvastatina y pravastatina) y agentes omega-3 (por ejemplo, LOVAZA, EPANQVA, VASCEPA, omega-3 esterificados en general, aceites de pescado, aceites de krill, aceites de algas). En algunas realizaciones, los agentes adicionales pueden seleccionarse entre anfetaminas, benzodiacepinas, sulfonilureas, meglitinidas, tiazolidindionas, biguanidas, betabloqueantes, inhibidores de XCE, diuréticos, nitratos, bloqueantes de los canales de calcio, fenlermina, sibutramina, iorcaserina, cetilistat, rimonabant, taranabant, topiramato, gabapentina, valproato, vigabatrina, bupropión, tiagabina, sertralina, fluoxetina, trazodona, zonisamida, metilfenidato, vareniclina, naltrexona, dietilpropión, fendimetrazina, repaglinida, nateglinida, glipepirida, metformina, pioglitazona, rosiglitazona y sitagliptina.

Se divulgan agentes utilizados para tratar la diabetes como agentes terapéuticos adicionales. Algunos agentes antidiabéticos ilustrativos incluyen, entre otros, sulfonilurea (por ejemplo, DYMELOS (acetohexamida), DIABINESE (clorpropamida), ORINASE (tolbutamida), y TOLINASE (tolazamida), GLUCOTROL (glipizida), GLUCOTROL XL (liberación prolongada), DIABETA (gliburida), MICRONASE (gliburida), GLYNASE PRESTAB (gliburida), y AMARYL (glipepirida)); una biguanida (por ejemplo, metformina (GLUCOPHAGE, GLUCOPHAGE XR, RIOMET, FORTAMET y GLUMETZA)); una tiazolidindiona (por ejemplo, ACTOS (pioglitazona) y AVANDIA (rosiglitazona)); un inhibidor de la alfa-glucosidasa (por ejemplo, PRECOSE (acarbose) y GLYSET (miglitol)); una meglitinida (por ejemplo, PRANDIN (repaglinida) y STARLIX (nateglinida)); un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (por ejemplo, JANUVIA (sitagliptina), NESINA (alogliptina), ONGLYZA (saxagliptina) y TRADJENTA (linagliptina)); un inhibidor del cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2) (por ejemplo, INVOKANA (canagliflozina)); y una píldora combinada (por ejemplo, GLUCOVANCE, que combina gliburida (una sulfonilurea) y metformina, METAGLIP, que combina glipizida (una sulfonilurea) y metformina, y AVANDAMET, que utiliza metformina y rosiglitazona (AVANDIA) en una sola píldora, KAZANO (alogliptina y metformina), OSENI (alogliptina más pioglitazona), METFORMIN oral, ACTOS oral, BYETTA subcutáneo, JANUVIA oral, WELCHOL oral, JANUMET oral, glipizida oral, glipepirida oral, GLUCOPHAGE oral, LANTUS subcutáneo, gliburida oral, ONGLYZA oral, AMARYL oral, LANTUS SOLOSTAR subcutáneo, BYDUREON subcutáneo, LEVEMIR FLEXPEN subcutáneo, ACTOPLUS MET oral, GLUMETZA oral, TRADJENTA oral, bromocriptina oral, KOMBIGLYZE XR oral, INVOKANA oral, PRANDIN oral, LEVEMIR subcutáneo, PARLODEL oral, pioglitazona oral, NOVOLOG subcutáneo, NOVOLOG FLEXPEN subcutáneo, VICTOZA 2-PAK subcutáneo, HUMALOG subcutáneo, STARLIX oral, FORTAMET oral, GLUCOVANCE oral, GLUCOPHAGE XR oral, NOVOLOG Mix 70-30 FLEXPEN subcutáneo, GLYBURIDE-METFORMIN oral, acarbose oral, SYMLINPEN 60 subcutáneo, GLUCOTROL XL oral, NOVOLIN R iny, GLUCOTROL oral, DUETACT oral, sitagliptina oral, SYMLINPEN 120 subcutáneo, HUMALOG KWIKPEN subcutáneo, JANUMET XR oral, GLIPIZIDA-METFORMINA oral, CYCLOSET oral, HUMALOG Mix 75-25 subcutáneo, nateglinida oral, HUMALOG Mix 75-25 KWIKPEN subcutáneo, HUMULIN 70/30 subcutáneo, PRECOSE oral, APIDRA subcutáneo, Humulin R iny, Jentadueto oral, Victoza 3-Pak subcutáneo, Novolin 70/30 subcutáneo, NOVOLIN N subcutáneo, insulina detemir subcutánea, gliburida micronizada oral, GLYNASE oral, HUMULIN N subcutáneo, insulina glargina subcutánea, RIOMET oral, pioglitazona-metformina oral, APIDRA SOLOSTAR subcutáneo, insulina lispro subcutánea, GLYSET oral, HUMULIN 70/30 Pen subcutáneo, colesevelam oral, sitagliptina-metformina oral, DIABETA oral, insulina humana normal iny, HUMULIN N Pen subcutánea, exenatida subcutánea, HUMALOG Mix 50-50 KWIKPEN subcutánea, linagliptina subcutánea, KAZANO oral, repaglinida oral, clorpropamida oral, insulina aspart subcutánea, NOVOLOG Mix 70-30 subcutánea, HUMALOG Mix 50-50 subcutánea, saxagliptina oral, ACTOPLUS Met XR oral, miglitol oral, insulina NPH humana recomb subcutánea, insulina NPH y normal humana subcutánea, tolazamida oral, mifepristona oral, insulina aspart protam-insulina aspart subcutánea, repaglinida-metformina oral, saxagliptina-metformina oral, linagliptina-metformina oral, NESINA oral, OSENI oral, tolbutamida oral, insulina lispro protamina y lispro subcutánea, pramlintida subcutánea, insulina glulisina subcutánea,

pioglitazona-glimepirida oral, PRANDIMET oral, NOVOLOG PenFill subcutánea, linagliptina oral, microesferas de exenatida subcutánea, KORLYM oral, alogliptina oral, alogliptina-pioglitazona oral, alogliptina-metformina oral, canagliflozina oral, Lispro (HUMALOG); aspart (NOVOLOG); glulisina (APIDRA); regular (NOVOLIN R o HUMULIN R); NPH (NOVOLIN N o HUMULIN N); glargina (LANTUS); detemir (LEVEMIR); HUMULIN o NOVOLIN 70/30; y NOVOLOG Mix 70/30 HUMALOG Mix 75/25 o 50/50.

La terapia combinada puede incluir la transfusión de sangre. Por ejemplo, las presentes composiciones pueden complementar una transfusión de sangre. En algunas realizaciones, la terapia combinada es con suplementos de hierro.

La terapia combinada puede incluir uno o más agentes basados en EPO. Por ejemplo, las presentes composiciones pueden utilizarse como coadyuvantes de otros agentes basados en EPO. En algunas realizaciones, las presentes composiciones se utilizan como terapia de mantenimiento de otros agentes basados en EPO. Otros agentes a base de EPO son los siguientes: epoetina alfa, incluidos, entre otros, DARBEPOETINA (ARANESP), EPOCEPT (LUPIN PHARMA), NANOKINE (NANOGEN PHARMACEUTICAL), EPOFIT (INTAS PHARMA), EPOGEN (AMGEN), EPOGIN, EPREX, (JANSSEN-CILAG), BINOCRIT (SANDOZ), PROCIT; epoetina beta, incluidos, entre otros, NEORECORMON (HOFFMANN-LA ROCHE), RECORMON, metoxipolietilenglicol-epoetina beta (MIRCERA, ROCHE); epoetina delta, incluidos, entre otros, DYNEPO (proteína estimulante de la eritropoyesis, SHIRE PLC); epoetina omega, incluidos, entre otros, EPOMAX; epoetina zeta, incluidos, entre otros, SILAPO (STADA) y RETACRIT (HOSPIRA) y otras EPO, incluidos, entre otros, EPOCEPT (LUPIN PHARMACEUTICALS), EPOTRUST (PANACEA BIOTEC LTD), ERYPRO SAFE (BIOCON LTD.), REPOITIN (SERUM INSTITUTE OF INDIA LIMITED), VINTOR (EMCURE PHARMACEUTICALS), EPOFIT (INTAS PHARMA), ERYKINE (INTAS BIOPHARMACEUTICA), WEPOX (WOCKHARDT BIOTECH), ESPOGEN (LG LIFE SCIENCES), RELIPOIETIN (RELIANCE LIFE SCIENCES), SHANPOIETIN (SHANTHA BIOTECHNICS LTD), ZYROP (CADILA HEALTHCARE LTD.), EPIAO (RHUEPO) (SHENYANG SUNSHINE PHARMACEUTICAL CO. LTD), CINNAPOIETINA (CINNAGEN).

La terapia combinada puede incluir uno o más agentes inmunomoduladores, por ejemplo, entre otros, agentes que modulan puntos de control inmunitario. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador se dirige a uno o más de PD-1, PD-L1 y PD-L2. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un inhibidor de PD-1. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico para uno o más de PD-1, PD-L1 y PD-L2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, entre otros, nivolumab, (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), pembrolizumab (KEYTRUDA, MERCK), pidilizumab (CT-011, CURE TECH), MK-3475 (MERCK), BMS 936559 (BRISTOL MYERS SQUIBB), MPDL3280A (ROCHE). En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador se dirige a uno o más de los CD137 o CD137L. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico para uno o más de CD137 o CD137L. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, entre otros, urelumab (también conocido como BMS-663513 y anticuerpo anti-4-1BB). En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica se combina con urelumab (opcionalmente con uno o más de nivolumab, lirilumab y urelumab) para el tratamiento de tumores sólidos y/o linfoma no hodgkiniano de linfocitos B y/o cáncer de cabeza y cuello y/o mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente dirigido a uno o más de CTLA-4, AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 y PPP2R5A. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico para uno o más de CTLA-4, AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 y PPP2R5A. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, entre otros, ipilimumab (MDX-010, MDX-101, Yervoy, BMS) y/o tremelimumab (Pfizer). En algunas realizaciones, la presente proteína quimérica se combina con ipilimumab (opcionalmente con bavituximab) para el tratamiento de uno o más de melanoma, cáncer de próstata y cáncer de pulmón. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador se dirige a CD20. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico de CD20. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, entre otros, ofatumumab (GENMAB), obinutuzumab (GAZYVA), AME-133v (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION), ocrelizumab (GENENTECH), TRU-015 (TRUBION/EMERGENT), veituzumab (IMMU-106).

La terapia combinada puede incluir uno o más agentes quiméricos descritos en los documentos WO 2013/10779, WO 2015/007536, WO 2015/007520, WO 2015/007542 y WO 2015/007903.

En algunas realizaciones, la proteína quimérica descrita en el presente documento incluye derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula a la composición, de tal manera que la unión covalente no impida la actividad de la composición. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados incluyen la composición que ha sido modificada, *inter alia*, por glucosilación, lipidación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc.

En otras realizaciones, la proteína quimérica descrita en el presente documento comprende además un agente citotóxico, que comprende, en realizaciones ilustrativas, una toxina, un agente quimioterapéutico, un radioisótopo y un agente que causa apoptosis o muerte celular. Dichos agentes pueden conjugarse con una composición descrita en el presente documento.

La proteína quimérica descrita en el presente documento puede modificarse postraduccionalmente para añadir elementos efectores, tales como conectores químicos, elementos detectables tales como, por ejemplo, colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos y elementos quimioluminiscentes, o elementos funcionales, tales como, por ejemplo, estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico y materiales radiactivos.

Algunos agentes citotóxicos ilustrativos incluyen, entre otros, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina; agentes alquilantes, tales como mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), mitomicina C, lomustina (CCNU), 1-metilnitrosourea, ciclofosfamida, mecloretamina, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino y carboplatino (paraplatino); antraciclinas, que incluyen daunorubicina (antes daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorubicina, carminomicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrona y bisantreno; antibióticos, que incluyen dactinomomicina (actinomomicina D), bleomicina, caliqueamicina, mitramicina y antramycin (AMC); y agentes antimitóticos, tales como alcaloides de la vinca, vincristina y vinblastina. Otros agentes citotóxicos son paclitaxel (taxol), ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, gemcitabina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, procarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, corticoesteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones y mezclas de estos agentes citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos incluyen, entre otros, agentes quimioterapéuticos, tales como carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, caliqueamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, actinomomicina D, ciclofosfamida, vincristina, bleomicina, antagonistas del VEGF, antagonistas del EGFR, platinas, taxoles, irinotecán, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, esteroides, ciclofosfamida, melfalán, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina), mustinas, inhibidores de la tirosina cinasa, radioterapia, antagonistas de las hormonas sexuales, moduladores selectivos de los receptores de andrógenos, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, antagonistas del PDGF, antagonistas del TNF, antagonistas de la IL-1, interleucinas (por ejemplo, IL-12 o IL-2), antagonistas de IL-12R, anticuerpos monoclonales conjugados con toxinas, anticuerpos monoclonales específicos de antígenos tumorales, Erbitux, Avastin, pertuzumab, anticuerpos anti-CD20, Rituxan, ocrelizumab, ofatumumab, DXL625, HERCEPTIN® o cualquier combinación de los mismos. Las enzimas tóxicas de plantas y bacterias, tales como la ricina, la toxina diftérica y la toxina de *Pseudomonas*, pueden conjugarse con los agentes terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos) para generar reactivos que maten a un tipo celular específico (Youle, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:5483 (1980); Gilliland, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:4539 (1980); Krolick, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:5419 (1980)).

Otros agentes citotóxicos incluyen ribonucleasas citotóxicas como las descritas por Goldenberg en la patente de EE. UU. n.º 6 653 104. Las realizaciones de la invención también se refieren a radioinmunoconjugados en los que un radionúclido que emite partículas alfa o beta se acopla de forma estable a la proteína quimérica, con o sin el uso de un agente formador de complejos. Estos radionúclidos incluyen emisores beta, tales como el fósforo-32, el escandio-47, el cobre-67, el galio-67, el itrio-88, el itrio-90, el yodo-125, el yodo-131, el samario-153, el lutecio-177, el renio-186 o el renio-188, y emisores alfa, tales como la astatina-211, el plomo-212, el bismuto-212, el bismuto-213 o el actinio-225.

Otros restos detectables ilustrativos incluyen, entre otros, peroxidasa de rábano picante, acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y luciferasa. Otros materiales fluorescentes ilustrativos son, entre otros, la rodamina, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la umbeliferona, la diclorotriazinilamina, la ficoeritrina y el cloruro de dansilo. Otros restos quimioluminiscentes ilustrativos incluyen, entre otros, el luminol. Otros materiales bioluminiscentes ilustrativos son, entre otros, la luciferina y la aequorina. Otros materiales radiactivos ilustrativos incluyen, entre otros, yodo-125, carbono-14, azufre-35, tritio y fósforo-32.

Procedimientos de tratamiento (no forman parte de la invención)

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento tienen aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluidos, entre otros, cáncer, infecciones, trastornos inmunitarios, anemia, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, cicatrización de heridas, enfermedades relacionadas con isquemia, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades metabólicas y muchas otras enfermedades y trastornos.

Además, cualquiera de los agentes presentes puede utilizarse en el tratamiento o la fabricación de un medicamento para tratar diversas enfermedades y trastornos, incluidos, entre otros, cáncer, infecciones, trastornos inmunitarios, enfermedades o afecciones inflamatorias, y enfermedades autoinmunitarias.

Se divulga el tratamiento de un paciente que tiene uno o más de cáncer, insuficiencia cardíaca, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de células falciformes, talasemia, pérdida de sangre, reacción a transfusión, diabetes, deficiencia de vitamina B12, enfermedad vascular del colágeno, síndrome de Shwachman, púrpura trombocitopénica, enfermedad celíaca, estado de deficiencia endocrina, tal como hipotiroidismo o enfermedad de Addison, enfermedad autoinmunitaria, tal como enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil, colitis ulcerosa; trastornos inmunitarios, tales como fascitis eosinofílica, hipoinmunoglobulinemia o

timoma/carcinoma tímico, enfermedad de injerto contra huésped, preleucemia, síndrome no hematológico (por ejemplo, Down, Dubowitz, Seckel), síndrome de Felty, síndrome urémico hemolítico, síndrome mielodisplásico, hemoglobinuria paroxística nocturna, osteomielofibrosis, pancitopenia, aplasia eritrocitaria pura, púrpura de Schoenlein-Henoch, paludismo, inanición proteica, menorragia, esclerosis sistémica, cirrosis hepática, estados hipometabólicos e insuficiencia cardíaca congestiva.

Se divulga el tratamiento de un paciente con cáncer. Tal como se utiliza en el presente documento, el cáncer se refiere a cualquier crecimiento incontrolado de células que pueda interferir con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales, e incluye tanto los tumores primarios como los metastásicos. Los tumores primarios o cánceres que migran de su ubicación original y siembran órganos vitales pueden acabar provocando la muerte del sujeto por el deterioro funcional de los órganos afectados. Una metástasis es una célula o grupo de células cancerosas, en otra ubicación distinta del tumor primario, que surgen de la diseminación de células cancerosas del tumor primario a otras partes del cuerpo. Las metástasis pueden acabar provocando la muerte del sujeto. Por ejemplo, los cánceres pueden incluir cánceres benignos y malignos, pólipos, hiperplasia, así como tumores latentes o micrometástasis.

Algunos cánceres ilustrativos que pueden tratarse incluyen, entre otros, carcinomas, por ejemplo, diversos subtipos, incluidos, por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transicionales, sarcomas (incluidos, por ejemplo, de hueso y tejido blando), leucemias (incluidas, por ejemplo, mieloide aguda, linfoblástica aguda, leucemias (por ejemplo, mieloide aguda, linfoblástica aguda, mieloide crónica, linfocítica crónica y de células pilosas), linfomas y mielomas (por ejemplo, linfomas de Hodgkin y no hodgkiniano, de cadena ligera, no secretores, MGUS y plasmocitomas), y cánceres del sistema nervioso central (por ejemplo, cerebrales (por ejemplo, gliomas (por ejemplo, astrocitoma, oligodendroglioma y ependimoma), meningioma, adenoma hipofisario y neuromas, y tumores de la médula espinal (por ejemplo, meningiomas y neurofibroma).

Algunos cánceres ilustrativos que pueden tratarse incluyen, entre otros, carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer óseo; cáncer cerebral y del sistema nervioso central; cáncer de mama; cáncer del peritoneo; cáncer cervical; coriocarcinoma; cáncer de colon y recto; cáncer del tejido conectivo; cáncer del aparato digestivo; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico (incluido el cáncer gastrointestinal); glioblastoma; carcinoma hepático; hepatoma; neoplasia intraepitelial; cáncer de riñón o renal; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón); melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de cavidad oral (labio, lengua, boca y faringe); cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rabdomiosarcoma; cáncer de recto; cáncer del aparato respiratorio; carcinoma de glándulas salivales; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de células escamosas; cáncer de estómago; cáncer de testículo; cáncer de tiroides; cáncer de útero o de endometrio; cáncer del aparato urinario; cáncer de vulva; linfoma, incluido el linfoma de Hodgkin y el linfoma no hodgkiniano, así como el linfoma de linfocitos B (incluido el linfoma no hodgkiniano (LNH) de bajo grado/folicular; linfoma no hodgkiniano (LNH) linfocítico pequeño (LS); linfoma no hodgkiniano de grado intermedio/folicular; linfoma no hodgkiniano de grado intermedio difuso; linfoma no hodgkiniano inmunoblástico de grado alto; linfoma no hodgkiniano linfoblástico de grado alto; linfoma no hodgkiniano de células pequeñas no hendidas de grado alto; linfoma no hodgkiniano de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el sida; y macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; así como otros carcinomas y sarcomas; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada a facomatosis, edema (por ejemplo, la asociada a tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

Se divulga el tratamiento de un paciente que tiene una infección microbiana y/o una infección crónica. Algunas infecciones ilustrativas incluyen, entre otras, VIH/sida, tuberculosis, osteomielitis, hepatitis B, hepatitis C, virus de Epstein-Barr o parvovirus, virus de la leucemia de linfocitos T, síndrome de sobrecrecimiento bacteriano, infecciones fúngicas o parasitarias.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones se usan para tratar o prevenir una o más enfermedades o afecciones inflamatorias, tales como inflamación, inflamación aguda, inflamación crónica, enfermedad respiratoria, aterosclerosis, reestenosis, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, choque séptico, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pélvica, dolor, enfermedad inflamatoria ocular, enfermedad celíaca, síndrome de Leigh, deficiencia de glicerol cinasa, eosinofilia familiar (EF), ataxia espástica autosómica recesiva, enfermedad inflamatoria laríngea; tuberculosis, colecistitis crónica, bronquiectasias, silicosis y otras neumonosis.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones se usan para tratar o prevenir una o más enfermedades o afecciones autoinmunitarias, tales como esclerosis múltiple, diabetes mellitus, lupus, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de Guillain-Barré, esclerodermias, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, epilepsia autoinmunitaria, encefalitis de Rasmussen, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, tiroiditis de Hashimoto, fibromialgia, síndrome de Menier; rechazo de trasplantes (por ejemplo, prevención del rechazo de aloinjertos), anemia perniciosa, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Grave y otras enfermedades autoinmunitarias.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones se usan para tratar, controlar o prevenir enfermedades cardiovasculares, tales como una enfermedad o afección que afecta al corazón y a la vasculatura, incluidas, entre otras, enfermedad cardíaca coronaria (ECC), enfermedad cerebrovascular (ECV), estenosis aórtica, enfermedad vascular periférica, aterosclerosis, arteriosclerosis, infarto de miocardio (ataque cardíaco), enfermedades cerebrovasculares (ictus), ataques isquémicos transitorios (AIT), angina de pecho (estable e inestable), fibrilación auricular, arritmia, enfermedad valvular y/o insuficiencia cardíaca congestiva.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones se utilizan para tratar o prevenir uno o más trastornos relacionados con el metabolismo. En diversas realizaciones, la presente invención es útil para el tratamiento, el control o la prevención de la diabetes, incluida la diabetes de tipo 1 y de tipo 2 y la diabetes asociada a la obesidad. Las composiciones y procedimientos de la presente invención son útiles para el tratamiento o la prevención de trastornos relacionados con la diabetes, incluidos, entre otros, nefropatía diabética, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad, trastornos lipídicos, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, niveles bajos de HDL, niveles altos de LDL, aterosclerosis y sus secuelas, reestenosis vascular, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, otras afecciones inflamatorias, pancreatitis, obesidad abdominal, enfermedad neurodegenerativa, retinopatía, afecciones neoplásicas, tumores de células adiposas, carcinomas de células adiposas, tales como el liposarcoma, cáncer de próstata y otros tipos de cáncer, incluidos los cánceres gástrico, de mama, de vejiga y de colon, angiogénesis, enfermedad de Alzheimer, psoriasis, hipertensión arterial, síndrome metabólico (por ejemplo, una persona tiene tres o más de los siguientes trastornos: obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo, hipertensión arterial y glucosa plasmática elevada en ayunas), hiperandrogenismo ovárico (síndrome del ovario poliquístico) y otros trastornos en los que la resistencia a la insulina es un componente, tal como la apnea del sueño. Las composiciones y procedimientos de la presente invención son útiles para el tratamiento, el control o la prevención de la obesidad, incluidos trastornos genéticos o ambientales, y trastornos relacionados con la obesidad. Los trastornos relacionados con la obesidad se asocian, son causados o son consecuencia de la obesidad. Algunos ejemplos de trastornos relacionados con la obesidad son la obesidad, la diabetes, comer en exceso, los atracones y la bulimia, la hipertensión, las concentraciones plasmáticas elevadas de insulina y la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la hiperlipidemia, el cáncer de endometrio, mama, próstata, riñón y colon, la artrosis, la apnea obstructiva del sueño, los cálculos biliares, las cardiopatías, los ritmos cardíacos anómalos y las arritmias, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva, la cardiopatía coronaria, la muerte súbita, el accidente cerebrovascular, la poliquistosis ovárica, el craneofaringioma, el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Frohlich, sujetos con deficiencia de GH, la variante normal de baja estatura, el síndrome de Turner y otras afecciones patológicas que muestren una actividad metabólica reducida o una disminución del gasto energético en reposo como porcentaje de la masa total sin grasa, por ejemplo, niños con leucemia linfoblástica aguda. Otros ejemplos de trastornos relacionados con la obesidad son el síndrome metabólico, el síndrome de resistencia a la insulina, las anomalías hormonales reproductivas, las disfunciones sexuales y reproductivas, tales como el deterioro de la fertilidad, la infertilidad, el hipogonadismo en los varones y el hirsutismo en las mujeres, los defectos fetales asociados a la obesidad materna, los trastornos de la motilidad gastrointestinal, tales como el reflujo gastroesofágico relacionado con la obesidad, trastornos respiratorios, tales como el síndrome de hipoventilación por obesidad (síndrome de Pickwick), la disnea, trastornos cardiovasculares, inflamación, tal como la inflamación sistémica de la vasculatura, la arteriosclerosis, la hipercolesterolemia, la lumbalgia, la enfermedad de la vesícula biliar, la hiperuricemia, la gota y el cáncer de riñón, y el aumento del riesgo anestésico. Las composiciones y procedimientos de la presente invención también son útiles para tratar la enfermedad de Alzheimer.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones se usan para tratar o prevenir una o más enfermedades respiratorias, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasia, rinitis alérgica, sinusitis, vasoconstricción pulmonar, inflamación, alergias, respiración impedida, síndrome de dificultad respiratoria, fibrosis quística, hipertensión pulmonar, vasoconstricción pulmonar, enfisema, síndrome pulmonar por hantavirus (SPH), síndrome de Loeffler, síndrome de Goodpasture, pleuresía, neumonitis, edema pulmonar, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, complicaciones asociadas a la infección por el virus respiratorio sincitial y otras enfermedades respiratorias.

En algunas realizaciones, las presentes composiciones se utilizan para tratar o prevenir una o más enfermedades neurodegenerativas. Algunas enfermedades neurodegenerativas ilustrativas incluyen, entre otras, la esclerosis múltiple (que incluye, entre otras, la esclerosis múltiple benigna, la esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR), la esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP), la esclerosis múltiple progresiva recidivante (EMPR) y la esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP)), la enfermedad de Alzheimer (que incluye, entre otras, la enfermedad de Alzheimer de inicio precoz, la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío y la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF)), la enfermedad de Parkinson y el parkinsonismo (que incluye, entre otras, la enfermedad de Parkinson idiopática, el parkinsonismo vascular, el parkinsonismo inducido por fármacos, la demencia con cuerpos de Lewy, el parkinsonismo hereditario, el parkinsonismo juvenil), la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, que incluye, entre otras, ELA esporádica, ELA familiar, ELA del Pacífico occidental, ELA juvenil, enfermedad de Hiramaya).

En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas pueden utilizarse en el tratamiento de heridas, por ejemplo, una herida que no cicatriza, una úlcera, una quemadura, o congelación, una herida crónica o aguda, una

herida abierta o cerrada, una herida interna o externa (algunos ejemplos de heridas externas son heridas penetrantes y no penetrantes). En diversas realizaciones, las presentes proteínas quiméricas pueden utilizarse en el tratamiento de isquemia, a modo de ejemplo no limitante, isquemia asociada con síndrome coronario agudo, lesión pulmonar aguda (LPA), infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), enfermedad oclusiva arterial, arteriosclerosis, defecto del cartílago articular, inflamación sistémica aséptica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria, fractura ósea, fractura ósea, edema cerebral, hipoperfusión cerebral, enfermedad de Buerger, quemaduras, cáncer, enfermedad cardiovascular, lesión del cartílago, infarto cerebral, isquemia cerebral, ictus cerebral, enfermedad cerebrovascular, neuropatía inducida por quimioterapia, infección crónica, isquemia mesentérica crónica, claudicación, insuficiencia cardíaca congestiva, daño del tejido conjuntivo, contusión, enfermedad arterial coronaria (EAC), isquemia crítica de las extremidades (ICMI), enfermedad de Crohn, trombosis venosa profunda, herida profunda, retraso en la cicatrización de úlceras, retraso en la cicatrización de heridas, diabetes (de tipo I y de tipo II), neuropatía diabética, isquemia inducida por diabetes, coagulación intravascular diseminada (CID), isquemia cerebral embólica, congelación, enfermedad de injerto contra huésped, telangiectasia hemorrágica hereditaria, enfermedad vascular isquémica, lesión hiperóxica, hipoxia, inflamación, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria, tendones lesionados, claudicación intermitente, isquemia intestinal, isquemia, enfermedad cerebral isquémica, cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica isquémica, placenta isquémica, enfermedad renal isquémica, enfermedad vascular isquémica, lesión por isquemia-reperusión, laceración, arteriopatía coronaria izquierda, isquemia de las extremidades, isquemia de las extremidades inferiores, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia de órganos, artrosis, osteoporosis, osteosarcoma, enfermedad de Parkinson, arteriopatía periférica, arteriopatía periférica, isquemia periférica, neuropatía periférica, enfermedad vascular periférica, precáncer, edema pulmonar, embolia pulmonar, trastorno de remodelación, isquemia renal, isquemia retiniana, retinopatía, sepsis, úlceras cutáneas, trasplante de órganos sólidos, lesión medular, ictus, quiste óseo subcondral, trombosis, isquemia cerebral trombótica, isquemia tisular, accidente isquémico transitorio (AIT), lesión cerebral traumática, colitis ulcerosa, enfermedad vascular renal, afecciones inflamatorias vasculares, síndrome de von Hippel-Lindau o heridas en tejidos u órganos

Se divulga el tratamiento de una o más de las anemias, incluidas la anemia resultante de la enfermedad renal crónica (por ejemplo, de la diálisis) y/o un agente anticanceroso (por ejemplo, quimioterapia y/o tratamiento del VIH [por ejemplo, zidovudina (INN) o azidotimidina (AZT)], enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), anemia vinculada a afecciones inflamatorias (por ejemplo, artritis, lupus, EII), anemia vinculada a la diabetes, esquizofrenia, malaria cerebral, tal como anemia aplásica, y mielodisplasia por el tratamiento del cáncer (por ejemplo, quimioterapia y/o radioterapia), y diversas enfermedades del síndrome mielodisplásico (por ejemplo, anemia falciforme, enfermedad de la hemoglobina SC, enfermedad de la hemoglobina C, alfa- y beta-talasemias, anemia neonatal tras el nacimiento prematuro y afecciones comparables).

Se divulga el tratamiento de un paciente que tiene anemia, es decir, una afección en la cual el número de glóbulos rojos y/o la cantidad de hemoglobina en los glóbulos rojos está por debajo de lo normal. En diversas realizaciones, la anemia puede ser aguda o crónica. Por ejemplo, las anemias presentes incluyen, entre otras, anemia ferropénica, anemia renal, anemia de enfermedades/inflamaciones crónicas, anemia perniciosa, tal como anemia aquilica macrocítica, anemia perniciosa juvenil y anemia perniciosa congénita, anemia relacionada con el cáncer, anemia relacionada con la lucha contra el cáncer (por ejemplo, anemia relacionada con la quimioterapia, anemia relacionada con la radioterapia), aplasia pura de eritrocitos, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia aplásica, anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, anemia hemolítica, anemia falciforme, anemia causada por una producción deficiente de AEE, síndromes de mielodisplasia, anemia hipocrómica, anemia microcítica, anemia sideroblástica, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia de Cooley, anemia mediterránea, anemia de Diamond Blackfan, anemia de Fanconi y anemia hemolítica inmunitaria inducida por fármacos. La anemia puede provocar síntomas graves, tales como hipoxia, fatiga crónica, falta de concentración, palidez, hipotensión, mareos e insuficiencia cardíaca.

Se divulga el tratamiento de la anemia resultante de la insuficiencia renal crónica. En algunas realizaciones, la anemia es el resultado del uso de una o más terapias de sustitución renal, incluidas diálisis, hemodiálisis, diálisis peritoneal, hemofiltración, hemodiafiltración y trasplante renal.

Se divulga el tratamiento de la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica que no están en diálisis. Por ejemplo, la presente invención se refiere a pacientes en estadio 1 de ERC, o estadio 2 de ERC, o estadio 3 de ERC, o estadio 4 de ERC, o estadio 5 de ERC. En algunas realizaciones, el presente paciente se encuentra en el estadio 4 de ERC o en el estadio 5 de ERC. En algunas realizaciones, el presente paciente ha sido sometido a un trasplante de riñón. Se describe el tratamiento de la anemia en un paciente con una lesión renal aguda (LRA).

En algunas realizaciones, la anemia es inducida por quimioterapia. Por ejemplo, la quimioterapia puede ser cualquier quimioterapia mielosupresora. En algunas realizaciones, la quimioterapia es una o más de revlimid, talomid, dexametasona, adriamicina y doxilo. En algunas realizaciones, la quimioterapia es uno o más fármacos basados en platino, incluidos cisplatino (por ejemplo, PLATINOL) y carboplatino (por ejemplo, PARAPLATIN). En algunas realizaciones, la quimioterapia se realiza con uno cualquiera de los agentes quimioterapéuticos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la quimioterapia es cualquier agente descrito en Groopman *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. (1999), 91 (19): 1616-1634. En algunas realizaciones, las presentes composiciones y procedimientos se utilizan en el tratamiento de la anemia relacionada con la quimioterapia en pacientes con cáncer en estadio

avanzado (por ejemplo, cáncer en estadio IV, III o II). En algunas realizaciones, las presentes composiciones y procedimientos se utilizan en el tratamiento de la anemia relacionada con la quimioterapia en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia de dosis densa u otros regímenes de quimioterapia agresiva.

5 Se divulga el tratamiento de la anemia en un paciente que tiene uno o más cánceres hemáticos, tales como leucemia, linfoma y mieloma múltiple. Estos cánceres pueden afectar directamente a la médula ósea. Además, la presente divulgación se refiere al cáncer metastásico que se ha extendido al hueso o a la médula ósea. Se divulga el tratamiento de la anemia en un paciente sometido a radioterapia. Dicha radioterapia puede dañar la médula ósea, disminuyendo su capacidad de producir glóbulos rojos. En otras realizaciones, la presente invención se refiere al tratamiento de la anemia en un paciente que tiene una reducción o deficiencia de uno o más de hierro, vitamina B12 y ácido fólico. En 10 otras realizaciones, el tratamiento de la anemia es en un paciente que tiene sangrado excesivo incluyendo, sin limitación, después de la cirugía o de un tumor que está causando una hemorragia interna. En otras realizaciones, el tratamiento de la anemia es en un paciente que tiene anemia de enfermedad crónica.

En algunas realizaciones, los presentes procedimientos y composiciones estimulan la producción de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, los presentes procedimientos y composiciones estimulan la división y diferenciación de 15 progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea.

Determinadas realizaciones de la presente invención son especialmente útiles para tratar la anemia inducida por quimioterapia en pacientes con cáncer. En algunas realizaciones, los presentes procedimientos y composiciones permiten la administración continuada de la proteína quimérica una vez finalizada la quimioterapia de un paciente con 20 cáncer. En algunas realizaciones, los presentes procedimientos y composiciones permiten el tratamiento de un paciente con cáncer sin reducción de la dosis en relación con un paciente sin cáncer. En algunas realizaciones, los presentes procedimientos y composiciones permiten el tratamiento de un paciente con cáncer que recibe quimioterapia y se considera curable. En diversas realizaciones, el paciente con cáncer tiene uno o más antecedentes de coágulos sanguíneos, cirugía reciente, periodos prolongados de reposo en cama o actividad limitada y tratamiento con un agente quimioterapéutico.

25 *Kits*

La invención también proporciona kits para la administración de cualquier agente descrito en el presente documento (por ejemplo, la proteína quimérica con o sin diversos agentes terapéuticos adicionales). El kit es un conjunto de materiales o componentes que incluye al menos una de las composiciones farmacéuticas de la invención descrita en el presente documentos. Así, en algunas realizaciones, el kit contiene al menos una de las composiciones 30 farmacéuticas descritas en el presente documentos.

La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit depende de su finalidad prevista. En una realización, el kit está configurado para el tratamiento de sujetos humanos.

Las instrucciones de uso pueden estar incluidas en el kit. Las instrucciones de uso suelen incluir una expresión tangible que describe la técnica que debe emplearse al utilizar los componentes del kit para obtener un resultado deseado, tal como el tratamiento de la anemia. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como 35 diluyentes, tampones, vehículos farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteo o medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil que reconocerán fácilmente los expertos en la materia.

Los materiales y componentes reunidos en el kit pueden ser proporcionados al facultativo conservados de cualquier forma cómoda y adecuada que conserve su función y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden suministrarse a temperatura ambiente, refrigerados o congelados. Los componentes suelen estar contenidos en materiales de envasado adecuados. En diversas realizaciones, el material de envasado se construye mediante procedimientos bien conocidos, preferentemente para proporcionar un entorno estéril y sin contaminantes. El material de envasado puede llevar una etiqueta externa que indique el contenido y/o la finalidad del kit y/o sus componentes. 40

45 *Definiciones*

Tal como se utiliza en el presente documento, "un/una" o "el/la" puede significar uno o más de uno.

Además, el término "aproximadamente" cuando se utiliza en relación con una indicación numérica referenciada significa la indicación numérica mencionada más o menos hasta un 10 % de dicha indicación numérica mencionada. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 50" abarca la franja de 45 a 55.

50 Una "cantidad eficaz", cuando se utiliza en relación con usos médicos, es una cantidad que es eficaz para proporcionar un tratamiento mensurable, una prevención o una reducción de la tasa de patogénesis de una enfermedad de interés.

Tal como se utiliza en el presente documento, algo está "disminuido" si una lectura de actividad y/o efecto se reduce en una cantidad significativa, tal como en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al 55 menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al

menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o más, hasta e incluyendo al menos aproximadamente un 100 %, en presencia de un agente o estímulo en relación con la ausencia de dicha modulación. Como comprenderá un experto en la materia, en algunas realizaciones, la actividad disminuye y algunas lecturas posteriores disminuirán, pero otras pueden aumentar.

Por el contrario, la actividad se "incrementa" si una lectura de actividad y/o efecto se incrementa en una cantidad significativa, por ejemplo en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o más, hasta e incluyendo al menos aproximadamente un 100 % o más, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, en presencia de un agente o estímulo, en relación con la ausencia de dicho agente o estímulo.

Tal como se menciona en el presente documento, todos los porcentajes de composición son en peso de la composición total, a menos que se especifique lo contrario. Tal como se utiliza en el presente documento, la palabra "incluir", y sus variantes, pretende ser no limitante, de modo que la enumeración de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que también pueden ser útiles en las composiciones y procedimientos de esta tecnología. Del mismo modo, el término "puede" y sus variantes pretende ser no limitante, de modo que la mención de que una realización puede comprender determinados elementos o características no excluye otras realizaciones de la presente tecnología que no contengan dichos elementos o características.

Aunque la expresión abierta "que comprende", como sinónimo de términos tales como incluyendo, conteniendo o teniendo, se utiliza en el presente documento para describir y reivindicar la invención, la presente invención, o realizaciones de la misma, pueden describirse como alternativa utilizando expresiones alternativas, tales como "que consiste en" o "que consiste fundamentalmente en"

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "preferido" y "preferentemente" se refieren a formas de realización de la tecnología que ofrecen determinadas ventajas, en determinadas circunstancias. Sin embargo, también pueden preferirse otras formas de realización, en las mismas circunstancias o en otras. Además, la mención de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la tecnología.

La cantidad de las composiciones descritas en el presente documento necesaria para lograr un efecto terapéutico puede determinarse empíricamente de acuerdo con los procedimientos convencionales para el objetivo concreto. Generalmente, para administrar agentes terapéuticos con fines terapéuticos, los agentes terapéuticos se administran a una dosis farmacológicamente eficaz. Una "cantidad farmacológicamente eficaz", "dosis farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o una cantidad capaz de lograr el resultado deseado, en concreto para tratar el trastorno o la enfermedad. Una cantidad eficaz, tal como se utiliza en el presente documento, incluiría una cantidad suficiente, por ejemplo, para retrasar el desarrollo de un síntoma del trastorno o enfermedad, alterar el curso de un síntoma del trastorno o enfermedad (por ejemplo, ralentizar la progresión de un síntoma de la enfermedad), reducir o eliminar uno o más síntomas o manifestaciones del trastorno o enfermedad, y revertir un síntoma de un trastorno o enfermedad. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente, independientemente de que se produzca una mejoría.

Las cantidades eficaces, la toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para aproximadamente el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en aproximadamente el 50 % de la población). La dosis puede variar en función de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL50/DE50. En algunas realizaciones, se prefieren composiciones y procedimientos que presenten grandes índices terapéuticos. Una dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, incluidos, por ejemplo, ensayos de cultivo celular. Asimismo, puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI50 determinada en cultivo celular, o en un modelo animal apropiado. Los niveles de las composiciones descritas en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosis concreta pueden controlarse mediante un bioensayo adecuado. La dosis puede ser determinada por un médico y ajustada, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento.

En determinadas realizaciones, el efecto resultará en un cambio cuantificable de al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 90 %. En algunas realizaciones, el efecto se

traducirá en un cambio cuantificable de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 70 %, o incluso aproximadamente un 90 % o más. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente, independientemente de que se produzca una mejoría.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, los "procedimientos de tratamiento" son igualmente aplicables al uso de una composición para tratar las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento y/o composiciones para su uso y/o usos en la fabricación de un medicamento para tratar las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento. La presente invención se ilustra más a fondo con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

- 10 El término "AcTaferon" se utiliza en el presente documento a veces para referirse a una quimera basada en interferón.

En los siguientes ejemplos, a menos que se indique, las mutaciones de IFN son con respecto a IFN- α 2 humano - SEQ ID NO: 336.

- 15 El mutante Q124R es representativo de un mutante atenuado de IFN alfa 2 humano que puede ensayarse *in vivo* en un modelo murino. En concreto, Q124R es una mutación del IFN humano que es adecuada para su uso en el ratón (es decir, es un IFN mutante humano que actúa en el ratón). Véase Nat. Comm., 2014, 5:3016. doi: 10.1038/ncomms4016.

El mutante R33A/E120R es representativo de un mutante IFN alfa 2 humano que no es funcional (y se utiliza como control)

El VHH anti-PD-1 humano utilizado en estos ejemplos es SEQ ID NO: 132.

- 20 El VHH anti-PD-1 humano utilizado en estos ejemplos es SEQ ID NO: 267.

El VHH anti-CLEC9A humano utilizado en estos ejemplos es R2CHCL24 (SEQ ID NO: 87).

El scFV anti-CD3 humano utilizado en estos ejemplos es el SEQ ID NO: 365.

El scFV anti-CD20 humano utilizado en estos ejemplos es el SEQ ID NO: 366.

El VHH anti-CD8 humano utilizado en estos ejemplos es R2HCD26 (SEQ ID NO:21).

- 25 Se usa el VHH anti-Bcl10 en estos ejemplos como control (dirigido a un antígeno irrelevante, es decir, "no dirigido").

Ejemplo 1: Caracterización de quimeras biespecíficas utilizando un modelo de melanoma B16 *in vivo*

- 30 Se diseñaron diversas construcciones quiméricas biespecíficas con restos de transporte dirigido anti-PD-L1 de ratón, anti-CD20 de ratón, anti-Clec9A de ratón y/o anti-CD8 de ratón y un dominio de señalización de interferón modificado (es decir, el interferón humano mutante (IFN) α 2-Q124R o R149A). A continuación, figura una lista de las construcciones quiméricas. Las actividades *in vivo* de la quimera se caracterizaron utilizando un modelo *in vivo* de melanoma B16.

- PBS	
- BCII.10-Q124R (10120)	
- PD-L1-Q124R (12246)	
- CLEC9A-Q124R (10666)	- CLEC9A-R149A (10685)
- CLEC9A-Q124R-PD-L1 (11645)	- CLEC9A-R149A-PD-L1 (13305)
- PD-L1-Q124R-CLEC9A (12938)	- PD-L1-R149A-CLEC9A
- CLEC9A-PD-L1-Q124R (13271)	- CLEC9A-PD-L1-R149A (13331)
- PD-L1-CLEC9A-Q124R (13272)	- PD-L1-CLEC9A-R149A (13332)
- CD8-Q124R (11487)	- CD8-R149A (13339)
- CD8-Q12.4R-PD-L1 (12277)	- CD8-R149A-PD-L1 (13306)
- PD-L1-Q124R-CD8 (12939)	- PD-L1-R149A-CD8
- CD8-PD-L1-Q124R (13309)	- CD8-PD-L1_R149A (13337)
- PD-L1-CD8-Q124R (13310)	- PD-L1-CD8-R149A (13338)
- CLEC9A-Q124R-CD8 (12942)	- CLEC9A-R149A-CD8
- CD8-Q124R-CLEC9A (12941)	- CD8-R149A-CLEC9A
- CLEC9A-CD8-Q124R	- CLEC9A-CD8-R149A
- CD8-CLEC9A-Q124R	- CD8-CLEC9A-R149A

La figura 1 muestra las actividades antitumorales de una construcción biespecífica de VHH anti-CD20-IFN α humano mutante (Q124R)-VHH anti-PD-L1 utilizando un modelo de tumor B16. En el experimento, se inocularon ratones C57BL/6 por vía subcutánea (50 μ l) con 6×10^5 células tumorales de melanoma B16mCD20cl1 (una línea celular de melanoma de ratón que expresa de forma estable CD20 de ratón). El tratamiento perilesional con 30 μ g de diversas construcciones (100 μ l) se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ± 10 mm² medido con calibrador. Las construcciones ensayadas incluían un VHH anti-PD-L1 monoespecífica, una construcción VHH anti-PD-L1-IFN α humano, mutante Q124R, monoespecífica, una construcción VHH anti-CD20-IFN α humano, mutante Q124R monoespecífica, y la construcción VHH anti-CD20-IFN α humano, mutante Q124R-VHH anti-PD-L1 biespecífica. La figura 1, panel A, demuestra que el anti-PD-L1 no tuvo ningún efecto en el modelo tumoral B16, mientras que la construcción monoespecífica PD-L1-Q124R mostró cierta actividad antitumoral y redujo el tamaño del tumor. El panel B demuestra que una quimera biespecífica que se dirige tanto a CD20 como a PD-L1 ("mCD20-Q124R-PD-L1") fue superior a una quimera monoespecífica que sólo se dirige a CD20 ("mCD20-Q124R") con respecto a la actividad antitumoral (panel B). Tanto en las construcciones biespecíficas como en las monoespecíficas, estaba presente un dominio de señalización de interferón modificado (Q124R).

La figura 2 muestra las actividades antitumorales de una quimera biespecífica ("Clec9A-Q124R-PD-L1") utilizando el modelo de tumor B16 descrito anteriormente. Como se muestra en la figura 2, la quimera biespecífica Clec9A-Q124R-PD-L1 fue superior a una quimera monoespecífica anti-Clec9A ("Clec9A-Q124R") y PD-L1 ("PD-L1-Q124R"). Todas las quimeras se fusionaron con interferón modificado: Q124R.

Tanto las construcciones biespecíficas mCD20-Q124R-PD-L1 como Clec9A-Q124R-PD-L1 demostraron ser seguras (figura 3 y figura 4). En cada figura, los paneles A-G muestran: cambio en el peso corporal de los ratones en los estudios tumorales descritos anteriormente (panel A), recuento de glóbulos blancos ("leuc") y recuento de linfocitos ("li") (panel B), recuento de neutrófilos ("ne") y recuento de monocitos ("mo") (panel C); recuento de glóbulos rojos ("eritro") y, para la figura 4, hemoglobina ("hb") (panel D); hemocrito ("hct"), volumen corpuscular medio ("mcv"), hemoglobina corpuscular media ("mch"), concentración corpuscular media de hemoglobina ("mchc") (panel E); hematíes vacuolados ("pi") (panel F); y volumen plaquetario medio ("mpv") (panel G).

La figura 5 muestra un estudio de un modelo de tumor B16 en el que una fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN α humano modificado (Q124R) proporcionó una mejor actividad antitumoral en comparación con la coadministración de una fusión de anti-Clec9A al IFN α humano modificado (Q124R) y una fusión de anti-PD-L1 al

IFN alfa humano modificado (Q124R) o la coadministración de una fusión de anti-Clec9A al IFN alfa humano modificado (Q124R) y un VHH anti-PD-L1.

También se analizaron las actividades antitumorales de una construcción quimérica biespecífica ("CD8-Q124R-PD-L1") utilizando el modelo de melanoma B16. Tal como se muestra en la figura 6, la fusión biespecífica (anti-CD8 y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) proporcionó una mejor actividad antitumoral en comparación con una fusión de anti-CD8 con IFN alfa humano modificado (Q124R).

Se utilizó un modelo de ratón sin el gen *Batf3* (*Batf3*^{-/-}) para estudiar el papel de las células dendríticas de presentación cruzada en la tumorigénesis y las actividades antitumorales de las construcciones biespecíficas. Los ratones *Batf3*^{-/-} C57BL6 carecen del gen *Batf3* y, por tanto, no tienen células dendríticas CD8α⁺ de presentación cruzada. En el experimento, los ratones *Batf3*^{-/-} fueron inoculados por vía subcutánea con células tumorales de melanoma B16mCD20cl1. Cuando los tumores alcanzaron determinado tamaño, los ratones fueron tratados con una fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R). Tal como se muestra en la figura 7, los ratones *Batf3*^{-/-} fueron más susceptibles a la formación de tumores y formaron tumores de mayor tamaño que los ratones C57BL6 de tipo salvaje. La administración de la fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) redujo el tamaño del tumor tanto en ratones *Batf3*^{-/-} como en ratones C57BL6 de tipo salvaje. Además, sin pretender quedar limitado por teoría alguna, la comparación de la eficacia de la fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con el IFN alfa humano modificado (Q124R) en los dos entornos genéticos subraya la importancia de las células dendríticas para la localización de Clec9A.

Ejemplo 2: Caracterización de quimeras biespecíficas utilizando un modelo *in vivo* de tumor mamario 4T1

Las actividades antitumorales de las diversas construcciones quiméricas mono-específicas y biespecíficas también se probaron utilizando un modelo de tumor mamario 4T1. En el experimento, se inocularon ratones con células de tumor mamario 4T1. Una vez que los tumores alcanzaron un determinado tamaño, los ratones fueron tratados con un VHH anti-PD-L1 mono-específico o una construcción VHH anti-PD-L1-IFN alfa humano, mutante Q124R mono-específica. Tal como se muestra en la figura 8, panel A, el anti-PD-L1 no tiene efecto en el modelo de tumor mamario 4T1 mientras que la construcción mono-específica PD-L1-Q124R tuvo actividad antitumoral.

La figura 8, el panel B muestra un estudio de un modelo de tumor mamario 4T1, en el que una fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) proporcionó una mejor actividad antitumoral en comparación con la coadministración de una fusión de anti-Clec9A al IFN alfa humano modificado (Q124R) y una fusión de anti-PD-L1 al IFN alfa humano modificado (Q124R) o la coadministración de una fusión de anti-Clec9A al IFN alfa humano modificado (Q124R) y un VHH anti-PD-L1.

La figura 8, el panel C muestra un estudio de un modelo de tumor mamario 4T1, en el que una fusión biespecífica (anti-CD8 y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) proporcionó una mejor actividad antitumoral en comparación con la coadministración de una fusión de anti-CD8 a IFN alfa humano modificado (Q124R) y una fusión de anti-PD-L1 a IFN alfa humano modificado (Q124R) o la coadministración de una fusión de anti-CD8 a IFN alfa humano modificado (Q124R) y un VHH anti-PD-L1.

Ejemplo 3: Terapia combinada con una quimera biespecífica y doxorubicina en los modelos de melanoma B16 y tumor mamario 4T1

Se ensayaron los efectos antitumorales de una terapia combinada usando doxorubicina y construcciones biespecíficas. En una serie de experimentos, se trasplantaron a ratones células B16 (una línea celular de melanoma de ratón que expresa de forma estable CD20 de ratón) para inducir tumores. En una segunda serie de experimentos, los ratones fueron trasplantados con células de tumor mamario 4T1. Posteriormente, los ratones fueron tratados con una fusión biespecífica (anti Clec9A de ratón y anti PD-L1 de ratón) con IFN alfa humano modificado (Q124R) con o sin doxorubicina. En una tercera serie de experimentos, los ratones fueron trasplantados con células de tumor mamario 4T1 y posteriormente tratados con una fusión biespecífica (anti-CD8 y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) con o sin doxorubicina. Tal como se muestra en la figura 9, paneles A-C, en los tres modelos tumorales, la combinación de la quimera biespecífica con doxorubicina redujo significativamente el tamaño del tumor en comparación con el tratamiento con la quimera biespecífica sola o con doxorubicina sola. De forma interesante, como se muestra en la figura 9, panel B, en el modelo de tumor mamario 4T1, el uso de la fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) con doxorubicina produjo un efecto curativo en 5 de 6 ratones (es decir, los ratones quedaron completamente libres de tumores). Del mismo modo, como se muestra en la figura 9, panel C, en el modelo de tumor mamario 4T1, el uso de la fusión biespecífica (anti-CD8 y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) con doxorubicina también produjo un efecto curativo en 3 de 6 ratones (es decir, los ratones quedaron completamente libres de tumores). Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, se cree que la combinación del agente biespecífico y la doxorubicina produjo un efecto sinérgico (es decir, la erradicación completa de los tumores) en comparación con el uso de los agentes individualmente.

El modelo de tumor 4T1 se utilizó para realizar un experimento de reexposición tumoral, en el que los ratones que permanecieron libres de tumores (es decir, los 5 ratones que estaban libres de tumores como se demuestra en la figura 9, panel B) se volvieron a exponer a células de tumor 4T1. Específicamente, en el experimento, los ratones fueron

inoculados inicialmente con células de tumor mamario 4T1 y tratados con una combinación de doxorubicina y una fusión de anti-Clec9A con IFN alfa humano modificado (Q124R) o una fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) como se ha descrito previamente (por ejemplo, en la figura 9). Los ratones que permanecieron libres de tumores se volvieron a tratar con 10^5 células de tumor 4T1 y se controló el crecimiento tumoral sin ningún tratamiento adicional.

Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, la figura 10 demuestra que la presente fusión biespecífica (anti-Clec9A y anti-PD-L1) con IFN alfa humano modificado (Q124R) proporcionó un efecto de memoria antitumoral.

Ejemplo 4: Eficacia de quimeras biespecíficas en un modelo de ratón de esclerosis múltiple

La eficacia de las construcciones biespecíficas en el tratamiento de la esclerosis múltiple se probó utilizando un modelo establecido de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratón. Concretamente, a los ratones se les administraron por vía subcutánea péptidos correspondientes a los epítomos inmunodominantes de MOG (MOG₃₅₋₅₅) suspendidos en adyuvante completo de Freund ("complete Freund's adjuvant", CFA) derivado de bacilos muertos de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). También se administró toxina pertussis a los ratones mediante inyecciones intraperitoneales en el día y dos días después. A continuación, los ratones se trataron entre los días 7 y 25 con 100 UI o 1000 UI de una quimera de fusión mono-específica de anti-Clec9A de ratón con IFN alfa humano Q124R modificado ("Clec9A-Q124R") o una quimera de fusión mono-específica de anti-mCD20 de ratón con IFN alfa humano Q124R modificado ("mCD20-Q124R") o una combinación de ambas quimeras mono-específicas. Como alternativa, los ratones se trataron con 100 UI o 1000 UI de una quimera biespecífica Clec9A-Q124R-mCD20 (es decir, bi1) o Clec-9A-mCD20-Q124R (es decir, bi2), que difieren en la configuración de los restos de transporte dirigido (es decir, los VHH anti-Clec9A y anti-mCD20) y el agente de señalización (es decir, IFN alfa, mutante Q124R). Los ratones fueron puntuados fenotípicamente cada día como se muestra en la figura 11, panel A.

Tal como se muestra en la figura 11, panel B, en la dosis de 100 UI, la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R mejoró significativamente las puntuaciones clínicas en comparación con el tratamiento con cualquiera de las quimeras mono-específicas o una combinación de las quimeras mono-específicas. La quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R también mostró actividades superiores en comparación con la quimera biespecífica Clec9A-Q124R-mCD20. Del mismo modo, en el nivel de dosis de 1000 UI, la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R mejoró significativamente las puntuaciones clínicas en comparación con el tratamiento con cualquiera de las quimeras mono-específicas o una combinación de las quimeras mono-específicas (figura 11, panel C). A este nivel de dosis, la quimera biespecífica Clec9A-Q124R-mCD20 también mostró actividades superiores en comparación con el tratamiento con cualquiera de las quimeras mono-específicas o una combinación de las quimeras mono-específicas (figura 11, panel C). Además, se demostró que la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R era segura a la dosis de 1000 UI. Tal como se muestra en la figura 11, panel D, a esta dosis, la quimera biespecífica no indujo linfopenia en los ratones tratados.

En resumen, tal como se muestra en la figura 11, panel E, la quimera biespecífica Clec9A-Q124R-mCD20 proporcionó una protección superior contra la esclerosis múltiple en el modelo EAE a una dosis de 1000 UI. En comparación, la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R proporcionó una protección superior contra la esclerosis múltiple en el modelo EAE tanto a la dosis de 100 UI como a la de 1000 UI y no indujo linfopenia en los ratones tratados (figura 11, panel F). De forma interesante, en los ratones tratados con 100 UI de la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R (es decir, bi2), 1 de cada 5 ratones no mostró ningún síntoma de la enfermedad.

También se llevaron a cabo experimentos para evaluar la eficacia de la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R al nivel de dosis de 5000 UI. En estos experimentos también se utilizó una quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-R149A de control. En estos experimentos, las quimeras biespecíficas se administraron a partir del día 7 o del día 12 y continuaron hasta el día 25.

Tal como se muestra en la figura 12, panel A, la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R mejoró significativamente las puntuaciones clínicas en comparación con los controles cuando se administró el día 7 o el día 12 a una dosis de 5000 UI. Más concretamente, cuando la quimera biespecífica se administró antes del inicio de la enfermedad, es decir, en el día 7, la aparición de la enfermedad se retrasó o se detuvo por completo. Es importante destacar que cuando la quimera biespecífica se administró después del inicio de la enfermedad, es decir, en el día 12, la progresión de la enfermedad se ralentizó. Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, la administración de la quimera biespecífica puede utilizarse tanto para la prevención como para el tratamiento (por ejemplo, ralentizar la progresión) de la esclerosis múltiple. La quimera biespecífica también pareció ser segura de usar a este nivel de dosis, ya que los ratones tratados no mostraron una pérdida significativa de peso corporal hasta el día 20 de tratamiento (figura 12, panel B). Tal como se muestra en la figura 12, panel C, la quimera biespecífica Clec-9A-mCD20-Q124R también retrasó significativamente el inicio y la incidencia de la enfermedad en comparación con los controles.

Ejemplo 5. Proliferación y activación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno tumoral con quimeras biespecíficas

La figura 13 muestra una evaluación de la proliferación y activación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno tumoral tanto en los ganglios linfáticos que drenan el tumor como en el bazo, dos órganos primordiales en la inducción de la inmunidad antitumoral.

Proliferación de linfocitos T específicos de antígeno tumoral

Para evaluar la proliferación de linfocitos T específicos de antígeno tumoral, se utilizaron linfocitos T CD8⁺ transgénicos de receptores de linfocitos T (células OT-I) que reconocen específicamente el antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) presente sobre las células tumorales B16-OVA. Se aislaron linfocitos T CD8⁺ del bazo de ratones C57BL/6 OT-I utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T CD8a (Miltenyi Biotec) y se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína 5 µM (CFSE, Thermo Fisher). Un millón de células OT-I purificadas CD8 marcadas con CFSE fueron transferidas adoptivamente a ratones C57BL/6 inoculados 9 días antes con 6×10^5 células de melanoma B16-OVA que expresaban ovoalbúmina. Un día después de la transferencia de OT-I, los ratones fueron tratados perilesionalmente con PBS o con 30 µg de quimera biespecífica de VHH anti-Clec9A/VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R. A algunos ratones se les inyectó además doxorubicina perilesional (3 mg/kg, Sigma). Cinco días después de la transferencia adoptiva de OT-I, se aislaron los ganglios linfáticos que drenaban el tumor y el bazo y se evaluó la proliferación de linfocitos T CD8 OT-I mediante citometría de flujo (figura 13, paneles A y C). Las muestras se adquirieron en un citómetro de enfoque acústico Attune Nxt (Life Technologies) y se analizaron utilizando el software FlowJo.

Activación de linfocitos T específicos de antígeno tumoral

Para analizar el fenotipo de los linfocitos T CD8 OT-I proliferados, se tiñeron suspensiones de células individuales de ganglios linfáticos que drenan el tumor y bazos para detectar diferentes marcadores de activación de linfocitos T. Por lo tanto, los receptores Fc se bloquearon utilizando el anticuerpo CD16/CD32 (eBioscience) antes de la tinción con CD8-APC (clon 53-6.7, BD Pharmingen), CD44-PercP-Cy5.5 (clon IMF7, Biolegend) y CD62L-APC-Cy7 (clon MEL-14, Biolegend). La estrategia de selección se realizó en primer lugar en células CD8⁺ de las que se seleccionaron los linfocitos T que diluyen en CFSE (en proliferación). Los linfocitos T indiferenciados se basaron en el fenotipo CD44^{bajo} CD62L^{alto}, los linfocitos T efectores en el fenotipo CD44^{alto} CD62L^{bajo} y los linfocitos T de memoria en el fenotipo CD44^{alto} CD62L^{alto} (figura 13, paneles B y D). Las muestras se adquirieron en un citómetro de enfoque acústico Attune Nxt (Life Technologies) y se analizaron utilizando el software FlowJo.

Está bien establecido que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ desempeñan un papel crucial en la erradicación de células tumorales. Los datos de este ejemplo demuestran, entre otras cuestiones, que la quimera biespecífica de VHH anti-Clec9A/VHH anti-PD-L1/IFN humano Q124R indujo la proliferación y activación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno tumoral tanto en los ganglios linfáticos que drenan el tumor (figura 13, paneles A y B) como en el bazo (figura 13, paneles C y D).

Ejemplo 6. Quimeras biespecíficas de Sirp1α y DNAM

Se evaluó la eficacia de la localización de PD-L1 de ratón mediante diversas quimeras de ratón biespecíficas. En concreto, se llevó a cabo un análisis FACS para cuantificar la fosforilación de STAT1 en la línea celular B16 positiva para PD-L1 de ratón.

Células B16 fueron estimuladas con diversas quimeras biespecíficas durante 15 minutos a 37 °C en medio DMEM suplementado con FBS al 10 %. Tras la estimulación, las células se fijaron añadiendo 1 volumen de tampón Fix Buffer I (BD Biosciences) durante 10 minutos a 37 °C, y se permeabilizaron resuspendiéndolas en 2 volúmenes de tampón Perm III Buffer I (BD Biosciences) durante 30 minutos en hielo. Las muestras se tiñeron con un anticuerpo anti-STAT1 pY701 (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4 °C y se analizaron con un FACSCalibur (BD Biosciences) y el software Cell Quest Pro Versión 4.0.2 (BD Biosciences).

Tal como se muestra en la figura 14, las células B16 se estimularon con 100 ng/ml de quimera biespecífica de VHH anti-Sirp1α de ratón/VHH anti-PD-L1 de ratón/IFN humano Q124R, quimera biespecífica VHH anti-DNAM de ratón/VHH anti-PD-L1 de ratón/IFN humano Q124R o VHH Bcl10 VHH-IFN humano Q124R o se dejaron sin estimular durante 15 minutos a 37 °C. Tras la fijación y permeabilización, las células se tiñeron para fosfo STAT1 y se analizaron en FACS. Los datos ilustran claramente que la localización de PD-L1 aumentó significativamente la fosforilación de STAT1 por las quimeras biespecíficas en comparación con la quimera no dirigida (VHH Bcl10).

Ejemplo 7. Localización de CD8 humano por quimeras mono-específicas y biespecíficas

La eficiencia de la localización de CD8 humano por quimeras humanas mono-específicas se examinó mediante la cuantificación de la fosforilación de STAT1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) positivas para CD8 positivas y negativas para CD8 por FACS.

Una quimera de VHH anti-CD8 humano/IFN humano R149A (es decir, construcción pmTW-SIgK-hCD8_R2HCD26 (SEQ ID NO:21)-(GGG)₂₀-hIFNa2_R149A-GGS-(His)₉) y VHH anti-CD8 humano/IFN humano R33A/E120A (es decir, construcción pmTW-SIgK-hCD8_R2HCD26 (SEQ ID NO:21)-(GGG)₂₀-hIFNa2_R33A/E120A-GGS-(His)₉) se produjeron en células Hek293F. Las células se cultivaron hasta una densidad de $0,6 \times 10^6$ células por ml en medio Freestyle y se transfectaron con 25K PEI (polietilenimina) según protocolos convencionales. Tres días después de la transfección, se añadió medio fresco a los cultivos y las células se cultivaron durante dos o tres días más. Se recogió el medio, se extrajeron las células por centrifugación y se esterizaron por filtración. Las proteínas recombinantes se

purificaron utilizando resina Ni Excel (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante y se eliminó el imidazol de las muestras con columnas PD10 (GE Healthcare).

Se aislaron PBMC de la capa leucoplaquetaria de donantes sanos usando centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare). Las células se lavaron dos veces con tampón FACS (FBS al 2 %, EDTA 1 mM en PBS) y se tiñeron con APC anti-CD8 humano (clon RPE-T8; BD Pharmingen) durante 20 minutos a 4 °C. Tras dos lavados, las células se estimularon con una dilución en serie de quimeras dirigidas a CD8 durante 15 minutos a 37 °C. Tras la fijación (10 minutos, 37 °C, tampón Fix Buffer I; BD Biosciences) y la permeabilización (30 minutos, en hielo, tampón Perm III Buffer I; BD Biosciences) y el lavado, las células se tiñeron con el anticuerpo Ab anti-STAT1 pY701 (BD Biosciences). Las muestras se adquirieron con un FACSCalibur (BD Biosciences), con el software Cell Quest Pro Versión 4.0.2 (BD Biosciences).

Se estimularon PBMC aisladas con una dilución en serie de quimeras dirigidas a CD8 (VHH anti-CD8 humano/IFN humano R149A, VHH anti-CD8 humano/IFN humano R33A/E120A, o VHH anti-Bcl10/IFN humano R149A) y se tiñeron para CD8 (APC) y pSTAT1 (PE). Los datos mostraron claramente que la actividad biológica del VHH anti-CD8 humano/IFN humano R149A y del VHH anti-Bcl10/IFN humano R149A eran comparables en células negativas para CD8 (figura 15, panel C), pero la localización de CD8 produjo un aumento claro y pronunciado (al menos 500 veces) de la fosforilación de STAT1 por el VHH anti-CD8 humano/IFN humano R149A (figura 15, paneles A y B). Las mutaciones combinadas de IFN en la quimera VHH anti-CD8 humano/IFN humano R33A/E120A bloquearon completamente la fosforilación de STAT1 y la localización de CD8 no rescató la actividad biológica. Esto contrastaba con la mutación IFN R149A, que mantenía la fosforilación de STAT1.

La eficacia de la localización de CD8 humano por quimeras humanas biespecíficas (VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A) también se examinó mediante la cuantificación de la fosforilación de STAT1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) positivas para CD8 y negativas para CD8 en FACS.

Se produjeron la quimera biespecífica VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN R149A humano (es decir, construcción pmTW-SlgK-hCD8_R2HCD26-(GGG)₁₀-hPD-L1 VHH-(GGG)₂₀-hIFNa2_R149A-GGS-(His)₉) y la quimera biespecífica VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120A (es decir, construcción pmTW-SlgK-hCD8_R2HCD26-(GGG)₁₀-hPD-L1 VHH-(GGG)₂₀-hIFNa2_R33A/E120A-GGS-(His)₉). Las células se cultivaron hasta una densidad de $0,6 \times 10^6$ células por ml en medio Freestyle y se transfectaron con 25K PEI (polietilenimina) según protocolos convencionales. Tres días después de la transfección, se añadió medio fresco a los cultivos y las células se cultivaron durante dos o tres días más. Se recogió el medio, se extrajeron las células por centrifugación y se esterilizaron por filtración. Las proteínas recombinantes se purificaron utilizando resina Ni Excel (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante y el imidazol de las muestras se eliminó con columnas PD10 (GE Healthcare).

Se aislaron PBMC de la capa leucoplaquetaria de donantes sanos usando centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare). Las células se lavaron dos veces con tampón FACS (FBS al 2 %, EDTA 1 mM en PBS) y se tiñeron con APC anti-CD8 humano (clon RPE-T8; BD Pharmingen) durante 20 minutos a 4 °C. Tras dos lavados, las células se estimularon con una dilución en serie de quimeras biespecíficas CD8/PD-L1 durante 15 minutos a 37 °C. Tras la fijación (10 minutos, 37 °C, tampón Fix Buffer I; BD Biosciences) y la permeabilización (30 minutos, en hielo, tampón Perm III Buffer I; BD Biosciences) y el lavado, las células se tiñeron con Ab anti-STAT1 pY701 (BD Biosciences). Las muestras se adquirieron con un FACSCalibur (BD Biosciences), con el software Cell Quest Pro Versión 4.0.2 (BD Biosciences).

Se estimularon PBMC aisladas con una dilución en serie de quimeras biespecíficas (quimera biespecífica VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A, quimera biespecífica VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120E, o VHH anti-Bcl10 humano/IFN humano R149A) y se tiñeron para CD8 (APC) y pSTAT1 (PE). La quimera biespecífica VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A fue aproximadamente 100 veces más eficaz en la fosforilación de STAT1 que el VHH anti-Bcl10 humano/IFN humano R149A en células negativas para CD8 (paneles D y F), apuntando a un efecto de transporte dirigido a PD-L1 en células que expresan PD-L1. El efecto de la localización de CD8 quedó claramente ilustrado por la diferencia en los niveles de pSTAT1 en las células positivas para CD8 (figura 15, panel E) frente a células negativas para CD8 (figura 15, panel F) tras la estimulación por la quimera biespecífica VHH anti-CD8 humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A. La mutación combinada del IFN humano R33A/E120A bloqueó por completo la fosforilación de STAT1 y la localización de CD8 y/o PD-L1 no rescató la actividad biológica. Esto contrastaba con la mutación R149A, que mantenía la fosforilación de STAT1.

Ejemplo 8. Quimeras mono-específicas y biespecíficas dirigidas a PD-L1 humano

La eficacia de las quimeras humanas (biespecíficas) dirigidas a PD-L1 humano se examinó mediante la cuantificación de la fosforilación de STAT1 en la línea celular MDA-MB-321 positiva para PD-L1 humano mediante análisis FACS. Las quimeras estudiadas fueron VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A; VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120R; VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A; VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120R; y VHH anti-Bcl10 humano/IFN humano R149A.

Las células MDA-MB-321 fueron estimuladas con quimeras humanas como se indica durante 15 minutos a 37 °C en medio DMEM suplementado con FBS al 10 %. Tras la estimulación, las células se fijaron añadiendo 1 volumen de tampón Fix Buffer I (BD Biosciences) durante 10 minutos a 37 °C, y se permeabilizaron resuspendiéndolas en 2 volúmenes de tampón Perm III Buffer I (BD Biosciences) durante 30 minutos en hielo. Las muestras se tiñeron con un Ab anti-STAT1 pY701 (BD Biosciences) durante 20 a 4 °C y se analizaron con un FACSCalibur (BD Biosciences) y el software Cell Quest Pro Versión 4.0.2 (BD Biosciences).

Se estimularon MDA-MB-321 con una dilución en serie (100 ng/ml; 1 sobre 5) de quimeras monoespecíficas (VHH PD-L1) y biespecíficas (VHH Clec9A y PD-L1) durante 15 minutos a 37 °C. Tras la fijación y permeabilización, las células se tiñeron para fosfo STAT1 y se analizaron en FACS. Los datos ilustran que la localización PD-L1 (en formato monoespecífico o biespecífico) aumentó fuertemente la fosforilación de STAT1 por quimeras que tenían la mutación IFN R149A, pero no las mutaciones IFN R33A/E120R. La quimera no dirigida (Bcl10 VHH) fue incapaz de señalar incluso a 100 ng/ml. Véase la figura 16.

Ejemplo 9: Construcciones biespecíficas con restos de transporte dirigido scFv

Se amplió el concepto biespecífico más allá de los VHH. Se generó un scFv anti-CD20 humano/scFv anti-CD3 humano/IFN R149A con la siguiente secuencia:

METDTLLLVVLLWVPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTF
 TRYTMHWWKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSST
 AYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGSTGGGG
 SGGGGSGGGSDIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQ
 KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPHRGSGSGTSYSLTISGMEADAATYYC
QQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGSGGQIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCSA
SSSVSYIHWFGQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTIS
RVEAEDAATYYCQQWTSNPFTFGGSGTKLEIKRGSTGGGGSGGGSGGG
GSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWWKQTPGRGLE
WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTTVSSVDGGSGGGSGGGSGGGSGGSR
 GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGSAAMCDL
 PQTHSLGSRRTLMLLAQMRRIQLFSLKDRDFGFGPQEEFGNQFQKAETIP
 VLHEMIQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIGGVGT
 ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWVWRAEIMASESLSTNLQ
 EQLRSKELEHHHHHH (SEQ ID NO: 367).

El péptido señal está subrayado, scFvCD3 está en negrita, scFvCD20 está en negrita y subrayado, hIFN α 2(R149A) está sombreado y los conectores conectan los restos de transporte dirigido y el agente señalizador.

La eficiencia de localización por la quimera biespecífica basada en scFv humano fue examinada por cuantificación de la fosforilación de STAT1 en células Daudi (positivas para CD20), Jurkat (CD3) o Wish (control negativo). Véase la figura 17.

Las células fueron estimuladas con quimeras biespecíficas como se indica durante 15 minutos a 37 °C en medio DMEM suplementado con FBS al 10 %. Tras la estimulación, las células se fijaron añadiendo 1 volumen de tampón Fix Buffer I (BD Biosciences) durante 10 minutos a 37 °C, y se permeabilizaron resuspendiéndolas en 2 volúmenes de tampón Perm III Buffer I (BD Biosciences) durante 30 minutos en hielo. Las muestras se tiñeron con un Ab anti-STAT1 pY701 (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4 °C y se analizaron con un FACSCalibur (BD Biosciences) y el software Cell Quest Pro Versión 4.0.2 (BD Biosciences).

Tal como se muestra en la figura 17, las células Daudi, Jurkat y Wish se estimularon con una dilución en serie (5000 ng/ml; 1 sobre 5) de la quimera scFv durante 15 minutos a 37 °C. Tras la fijación y permeabilización, las células se tiñeron para fosfo STAT1 y se analizaron mediante análisis FACS. Los datos ilustraban claramente que la fosforilación de STAT1 era más eficaz en las células Jurkat (que expresan CD3) y Daudi (que expresan CD20) en comparación con las células Wish, debido a la localización de CD3 y CD20, respectivamente.

Ejemplo 10. Efectos antitumorales modelizados en seres humanos

Selección de sangre de cordón umbilical humano

- 5 Las células madre eran histocompatibles con la expresión de HLA-A2 por las células tumorales utilizadas durante los experimentos. A tal fin, sólo se seleccionaron las sangres de cordón umbilical positivas para HLA-A2 positivas para proceder a la purificación de células madre CD34. Las células se tiñeron con HLA-A2-FITC (BD Pharmingen) o HLA-ABC-PE (BD Pharmingen), este último como control positivo. Las muestras se adquirieron en un citómetro de focalización acústica Attune Nxt (Life Technologies).

Purificación de células madre CD34⁺ de sangre de cordón umbilical humano

- 10 Se aislaron células mononucleares viables de sangre de cordón umbilical humano usando la separación en gradiente Fycoll (Lymphoprep, Stemcell technologies) antes del aislamiento de MACS CD34⁺ usando el kit de aislamiento directo de células progenitoras CD34⁺ (Miltenyi). Para evaluar la pureza de las células madre aisladas se utilizó una citometría de flujo con CD3 humano-PE (BD Pharmingen)/CD34 humano-APC (BD Pharmingen). Las muestras se adquirieron en un citómetro de focalización acústica Attune Nxt (Life Technologies). La pureza de las células inyectadas alcanzó el 95-98 %.

Generación de ratones humanizados

- 15 Ratones NSG recién nacidos (1-2 días de edad) fueron irradiados subletalmente con 100 cGy antes de la administración intrahepática de 10⁵ células madre humanas CD34⁺. A las 6 semanas de la transferencia de CD34, se analiza la sangre periférica en busca de la presencia de células CD45 humanas y de ratón (ambas BD) para analizar el efecto del injerto. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo LSR (BD) y se analizaron con el software FACS Diva (BD).
- 20 El potencial antitumoral de las quimeras se evaluó en modelos de ratones humanizados portadores de tumores. Ratones NSG recién nacidos (1-2 días de edad) fueron irradiados subletalmente con 100 cGy antes de la administración intrahepática de 10⁵ células madre humanas CD34⁺ (procedentes de sangre de cordón umbilical positiva para HLA-A2). En la semana 13 después de la transferencia de células madre, los ratones fueron inoculados s.c. con 2,5 × 10⁶ células de linfoma folicular humano RL. Los ratones fueron tratados i.p. diariamente a partir del día 6 tras la inoculación del tumor con 30 µl de proteína Flt3L. La administración diaria de quimeras perilesionales (30 µg)
- 25 se inició el día 10 tras la inoculación del tumor, cuando se alcanzó un tumor palpable. El tratamiento con la quimera biespecífica VHH anti-Clec9a humano/VHH anti-PDL1 humano/IFN humano-R149A produjo una estabilización del crecimiento tumoral, que fue aún más pronunciada cuando se combinó con inyecciones de Flt3L en contraste con la inyección de PBS. El gráfico muestra el crecimiento tumoral como media ± EEM.
- 30 De manera importante, la quimera biespecífica VHH anti-Clec9a humano/VHH anti-PDL1 humano/IFN humano-R149A mostró claros efectos antitumorales en un tumor humano (RL) cultivado en ratones humanizados (ratones con un sistema inmune humano reconstituido). Véase la figura 18.

Ejemplo 11. Señalización de células dendríticas inducida por quimeras VHH biespecíficas antihumanas

- 35 Se realizó un ensayo de señalización de pSTAT de células dendríticas. Las quimeras estudiadas fueron VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R149A y VHH anti-Clec9A humano/VHH anti-PD-L1 humano/IFN humano R33A/E120R. Se estudiaron dos dosis de los agentes: 100 ng/ml y 500 ng/ml.

- 40 Brevemente, se aislaron PBMC humanas de sangre obtenida de donantes sanos. Se extrajeron aproximadamente 120 ml de sangre de cada donante utilizando tubos recubiertos de heparina (12 tubos). La sangre se mantuvo a temperatura ambiente y se procesó inmediatamente. Brevemente, la sangre se diluyó 1:1 con DPBS y se colocaron 25 ml suavemente en capas sobre 15 ml de Lympholyte H. Tras la centrifugación, se recogieron los anillos de células mononucleares y las células se lavaron tres veces con DPBS (PBS disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Wisent, n.º de catálogo 311-425-LL) y se contaron. Las células dendríticas se enriquecieron a partir de la población de PBMC utilizando un "kit de enriquecimiento de CD" que contenía una combinación de anticuerpos monoclonales específicos de linaje en PBS y una suspensión de partículas magnéticas (STEMCELL Technologies, número de catálogo 19251), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 45

- 50 Se estimularon células dendríticas (CD) durante 15 minutos en presencia o ausencia de elementos de ensayo y controles (PBS) y se determinó el nivel de STAT1 fosforilado (pSTAT1, específicamente pY701-STAT1) en poblaciones de células CD aisladas (Lin-(CD14/CD16/CD20/CD56/CD3)/HLA-DR+) por citometría de flujo. Tras la estimulación, se fijaron las células (tampón de fijación BD Cytofix, BD Bioscience, n.º de catálogo 554655) y, a continuación, se permeabilizaron con tampón Perm II (tampón Perm BD PhosFlow, BD Bioscience, n.º de catálogo 558052). A continuación, se tiñeron las células para detectar fosfoSTAT1 y marcadores de la superficie de CD (Lin-/HLA-DR+) (véase la tabla siguiente). Tanto la tinción intracelular como la de la superficie se realizaron al mismo tiempo. La citometría de flujo y la adquisición de datos se realizaron tras el lavado celular con DPBS.

Tabla con la lista de anticuerpos para la tinción por citometría de flujo

Marcador/Nombre del producto	Fluorocromo	Clon	Propósito	Proveedor-Número de catálogo
pSTAT1	AlexaFluor647	4a	fosfo-STAT1	BD-562070
Anti-CD3 humano	PE	UCHT1	Marcador de linfocitos T, Merma del linaje	BD-561809
Anti-CD14 humano	PE	M5E2	Marcadores de monocitos, Merma del linaje	BD-555398
anti-CD16 humano	PE	B73.1	Marcador de NK, neutrófilos, monocitos, Merma del linaje	BD-561313
anti-CD19 humano	PE	HIB19	Marcador de linfocitos B, Merma del linaje	BD-555413
anti-CD56 humano	PE	B159	Marcador de linfocitos NK, Merma del linaje	BD-555516
Anti-HLA-DR humano	FITC	TU36	Marcador de MHC II, Discriminación de CD	BD-555560
Anti-CD11c humano	BV421	B-Ly6	Discriminación de CD	BD-562561
Tinte de células muertas LIVE/DEAD Fixable Aqua	Aqua	N/Ap	Tinte de viabilidad	ThermoFisher-L34957
IgG normal de ratón	Nlap	N/Ap	Bloqueante del receptor de Fc, Agente bloqueante	ThermoFisher-10400C

La figura 19 muestra los datos, expresados como cambio en número de veces del porcentaje de células dendríticas pSTAT⁺.

- 5 Este estudio demuestra claramente que una construcción dual (bienespecífica) dirigida a antígenos CLEC9A/PD-L1 humanos que comprende un agente de señalización de IFN cuya actividad es recuperable al dirigirse a la célula (IFN R149A) estimula la señalización de IFN en células dendríticas humanas (según lo determinado por la inducción de pSTAT1). Por el contrario, no se observa activación de la señalización de IFN con una construcción bienespecífica dirigida a antígenos CLEC9A/PD-L1 que incorpora un agente de señalización de IFN cuya actividad no es recuperable (IFN R33A/E120R). Por lo tanto, como se observó en el caso de construcciones de fusión de IFN comparables dirigidas a
- 10 los antígenos CLEC9A y PD-L1 de ratón, dirigir el IFN a células dendríticas humanas utilizando un resto de transporte dirigido que se dirige al antígeno CLEC9A humano desencadena una transducción de señal de IFN pronunciada.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica que comprende:

(a) un agente de señalización modificado, en el que el agente de señalización modificado es un interferón alfa 2 humano mutante (IFN α 2) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 336 y con una o más mutaciones en las posiciones 144-154;

(b) un primer resto de transporte dirigido que comprende un dominio de reconocimiento seleccionado entre un anticuerpo de dominio único (sdAb), un fragmento variable monocatenario (scFv) o un Fab que se une específicamente a un primer antígeno o receptor de interés; y

(c) un segundo resto de transporte dirigido que comprende un dominio de reconocimiento seleccionado entre un anticuerpo de dominio único (sdAb), un fragmento variable monocatenario (scFv) o un Fab que se une específicamente a un segundo antígeno o receptor de interés;

en el que el IFN α 2 humano mutante tiene una afinidad o actividad reducida por su receptor en relación con el IFN α 2 humano de tipo salvaje; y

en el que la afinidad o actividad reducida del IFN α 2 humano mutante por su receptor puede ser restaurada por uno o más de los restos de transporte dirigido,

en el que el primer resto de transporte dirigido está unido al segundo resto de transporte dirigido, y el segundo resto de transporte dirigido está unido al agente de señalización modificado.

2. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en la que el IFN α 2 humano comprende una o más mutaciones en la posición R149, M148 o L153.

3. La proteína quimérica de la reivindicación 2, en la que la mutación es R149A.

4. La proteína quimérica de la reivindicación 2, en la que la mutación es M148A.

5. La proteína quimérica de la reivindicación 2, en la que la mutación es L153A.

6. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en la que el segundo antígeno o receptor de interés es el miembro A de la familia 9 del dominio de lectina de tipo C (Clec9A), el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), grupo de diferenciación 3 (CD3), grupo de diferenciación 8 (CD8), grupo de diferenciación 20 (CD20), proteína alfa reguladora de señales (Sirp1 α) o molécula accesoria DNAX (DNAM).

7. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en la que el primer antígeno o receptor de interés es PD-L1 y el segundo antígeno o receptor de interés es CD20, Clec9A, CD8 o Sirp1 α .

8. La proteína quimérica de la reivindicación 1, en la que el primer antígeno o receptor de interés es PD-L1 y el segundo antígeno o receptor de interés es Clec9A.

9. La proteína quimérica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de reconocimiento:

(a) modula funcionalmente el antígeno o receptor de interés; o

(b) no modula funcionalmente el antígeno o el receptor de interés.

10. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo de dominio único es un VHH, o un VHH humanizado.

11. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer.

FIG. 1

A.

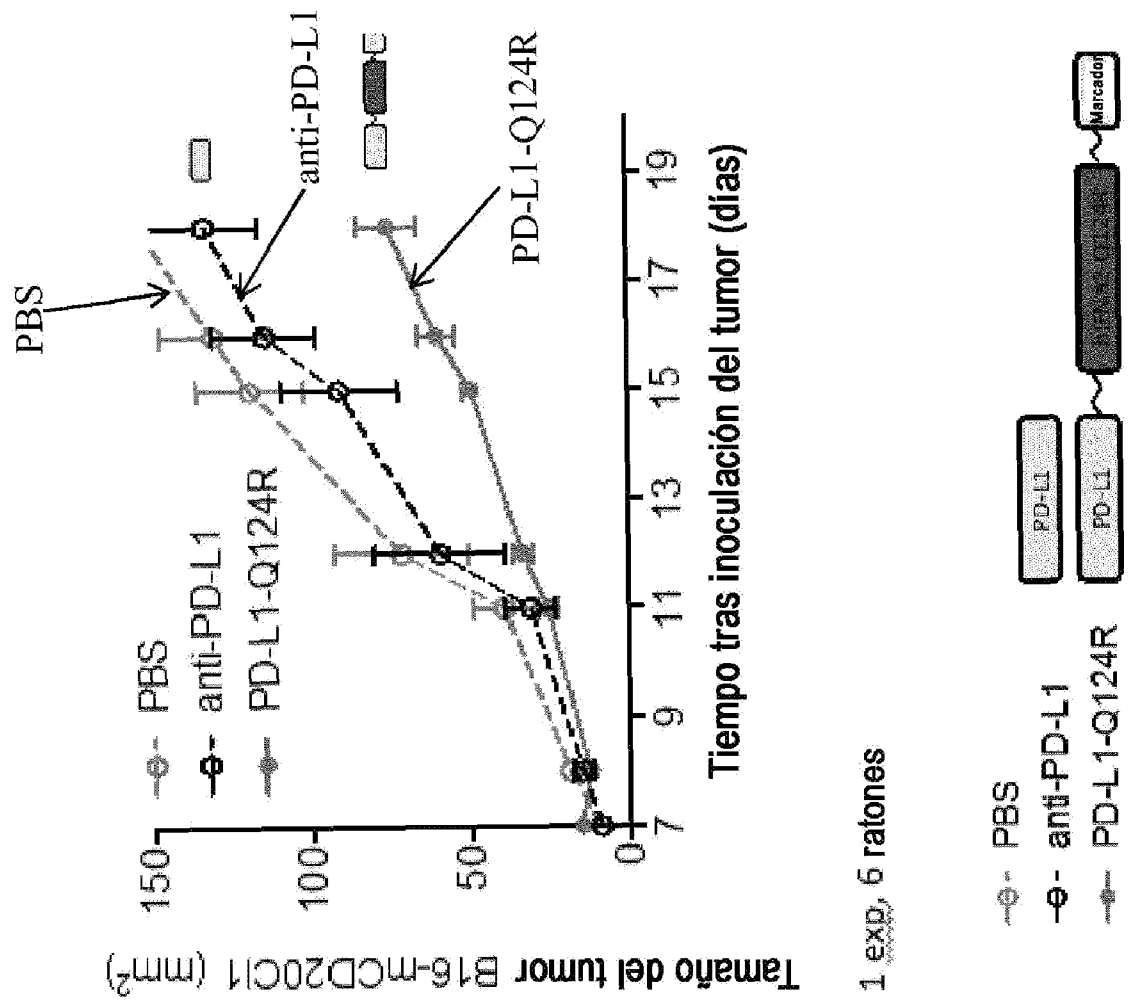


FIG. 1 (CONT.)

B.

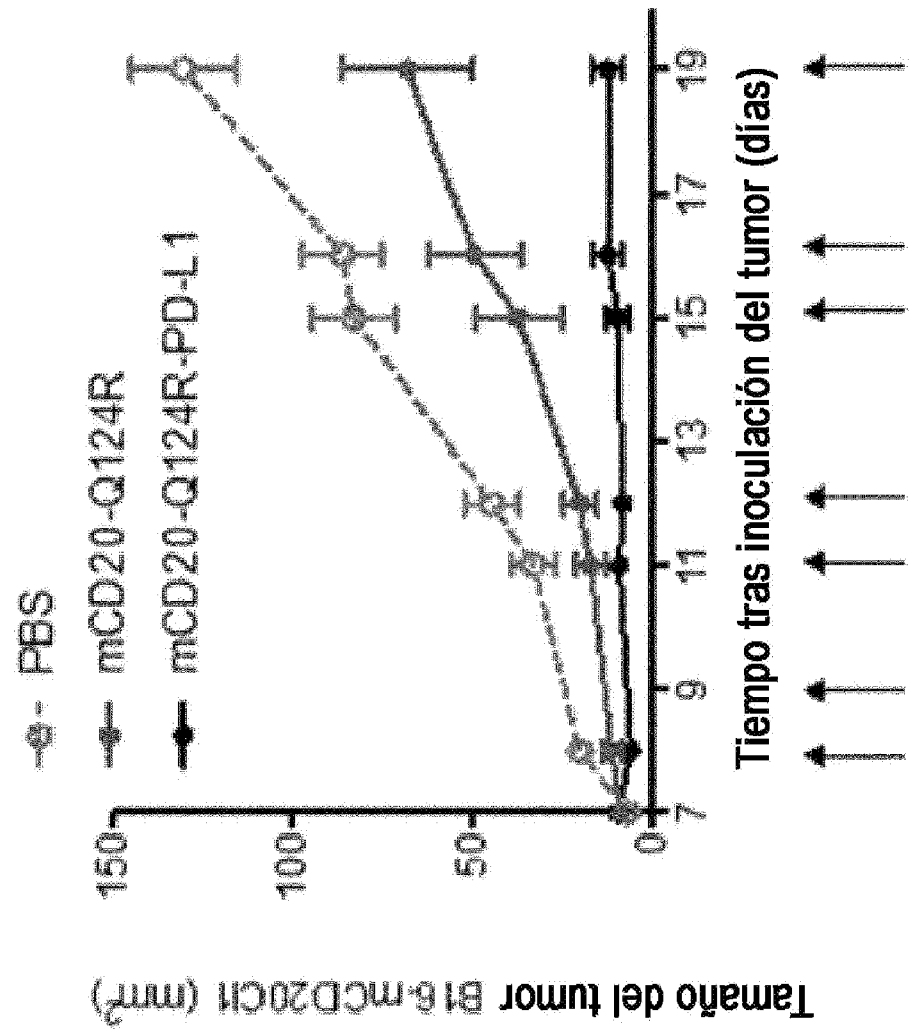


FIG. 2

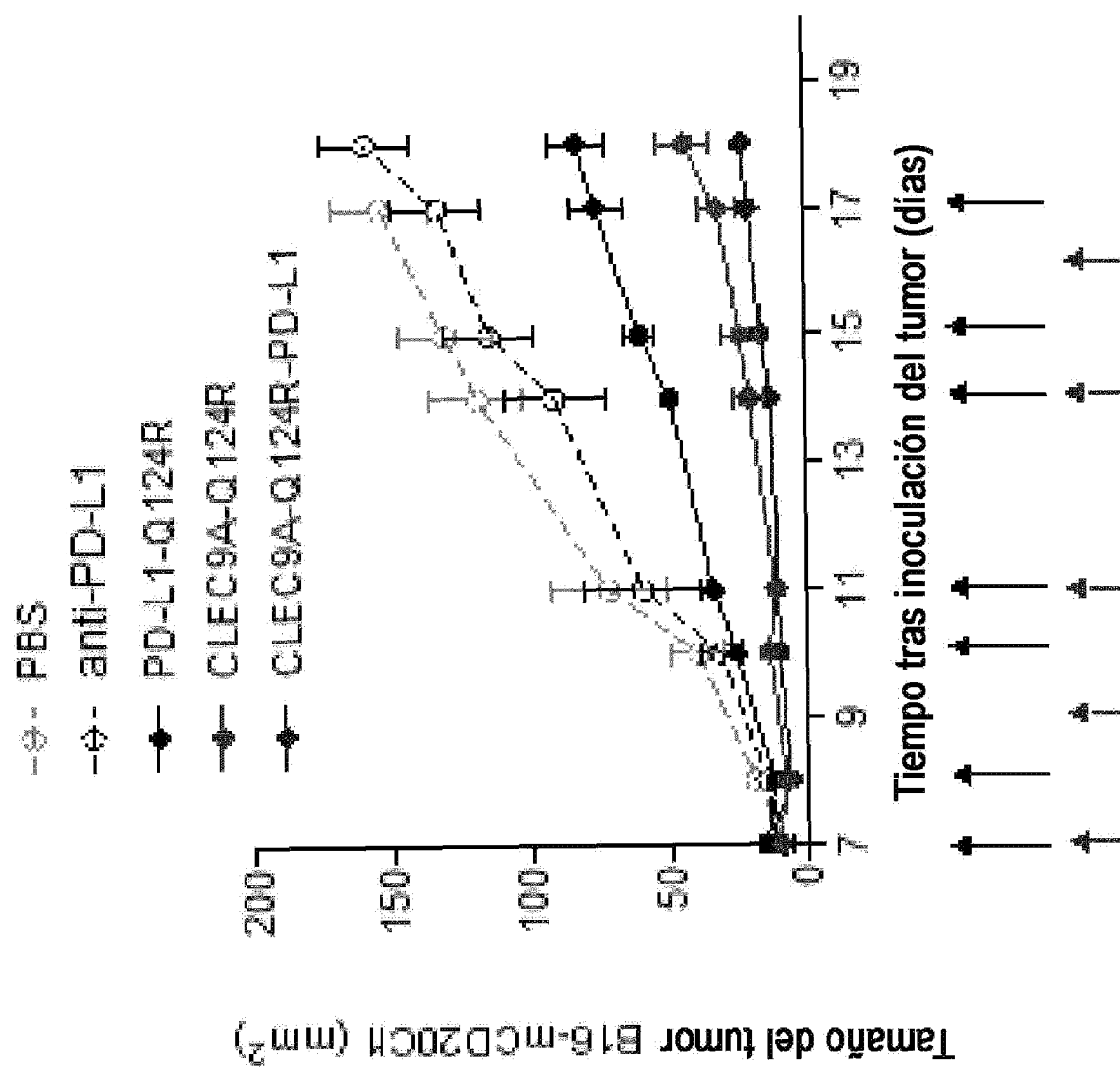


FIG. 3

A

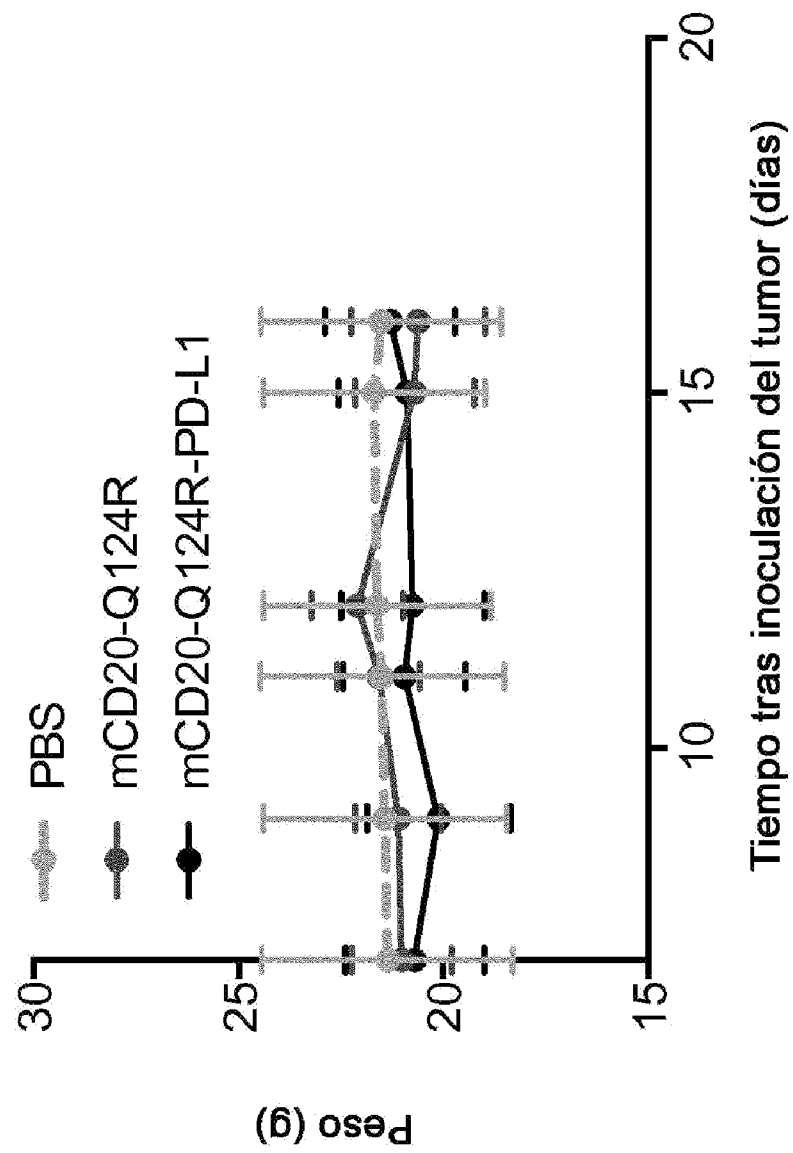


FIG. 3 (CONT.)
B.

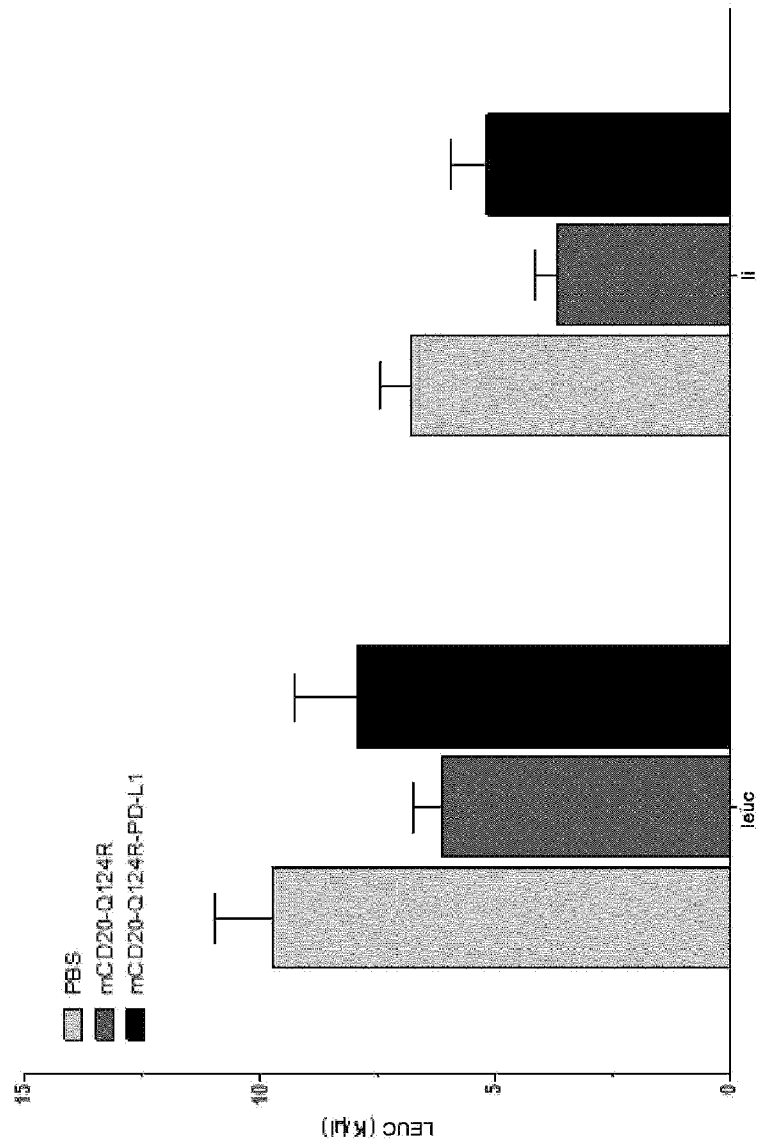


FIG. 3 (CONT.)
C.

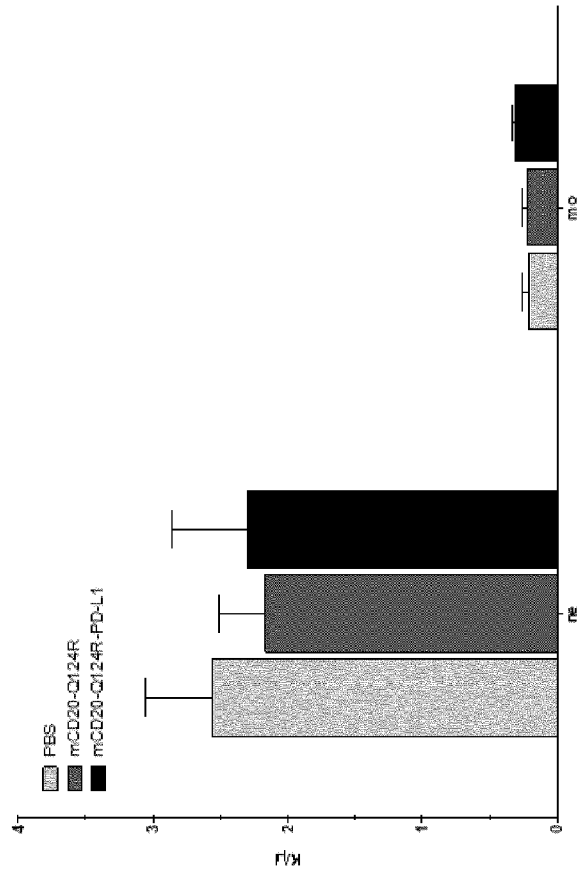


FIG. 3 (CONT.)
D.

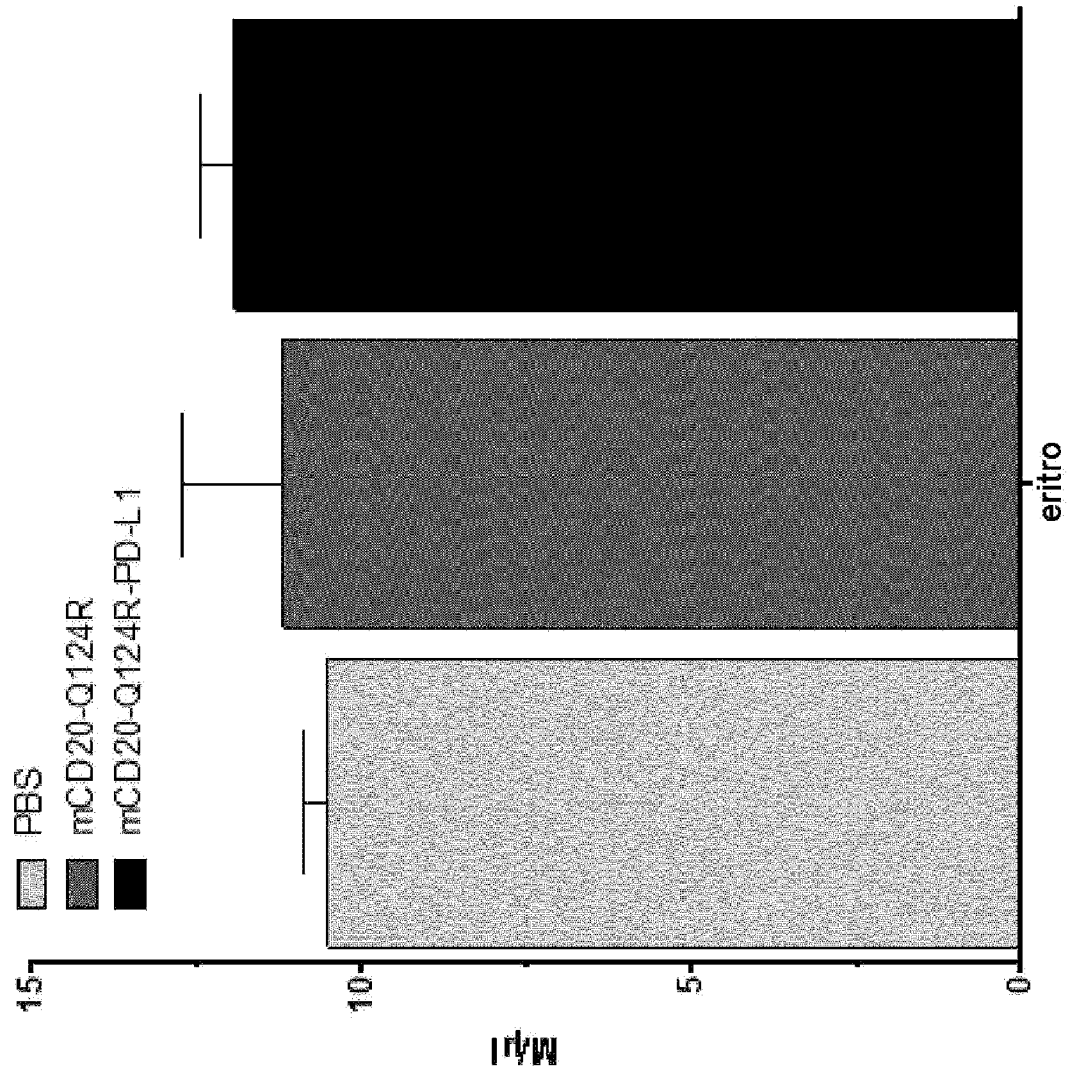


FIG. 3 (CONT.)
E.

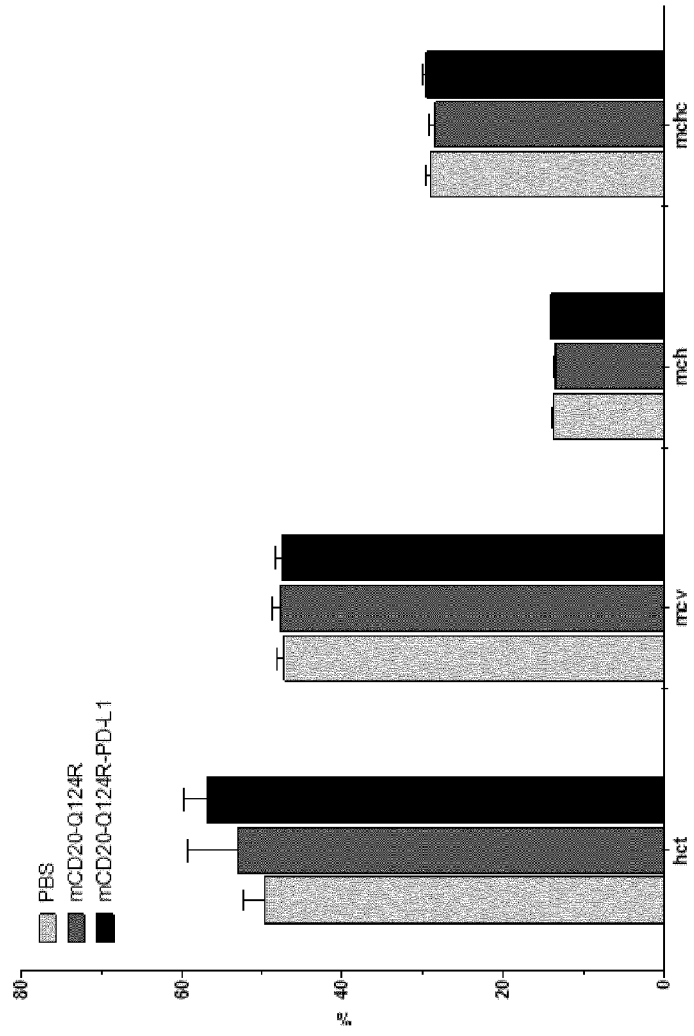


FIG. 3 (CONT.)
F.

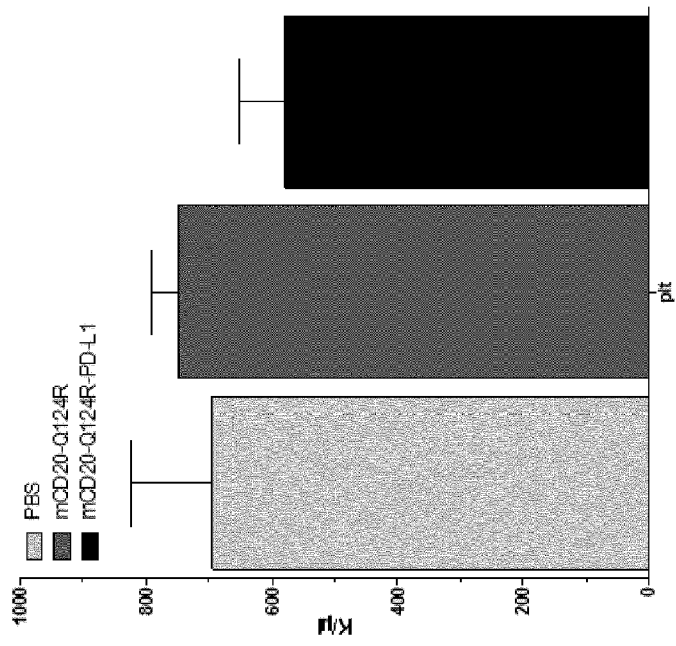


FIG. 3 (CONT.)
G.

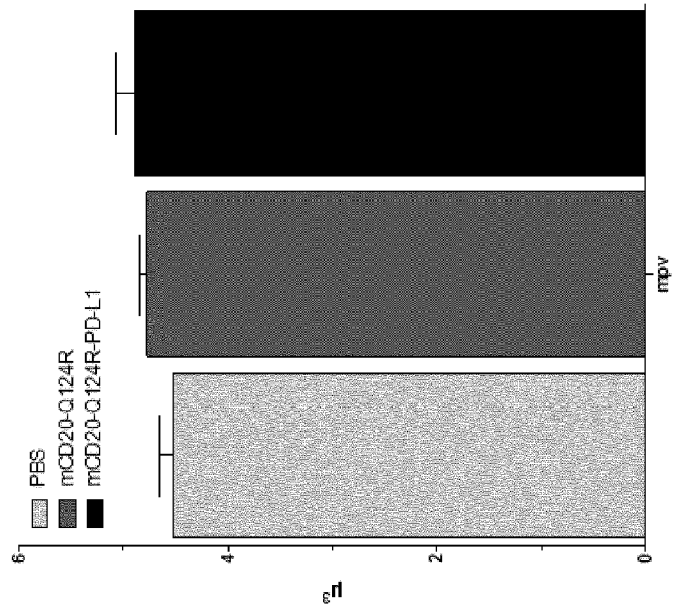


FIG. 4
A.

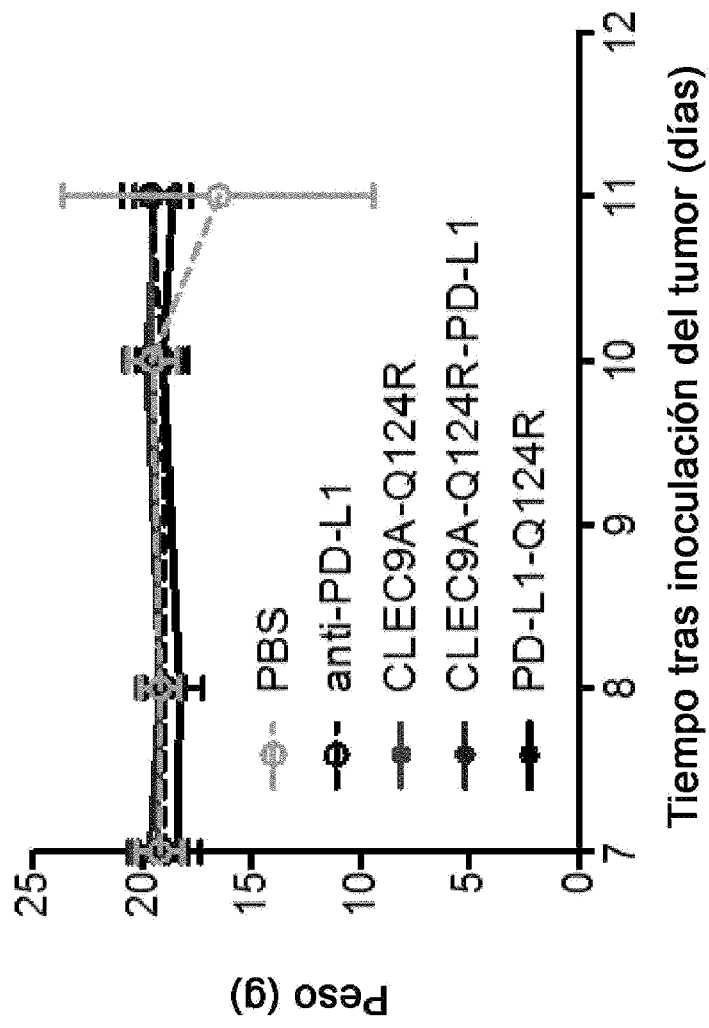


FIG. 4 (CONT.)
B.

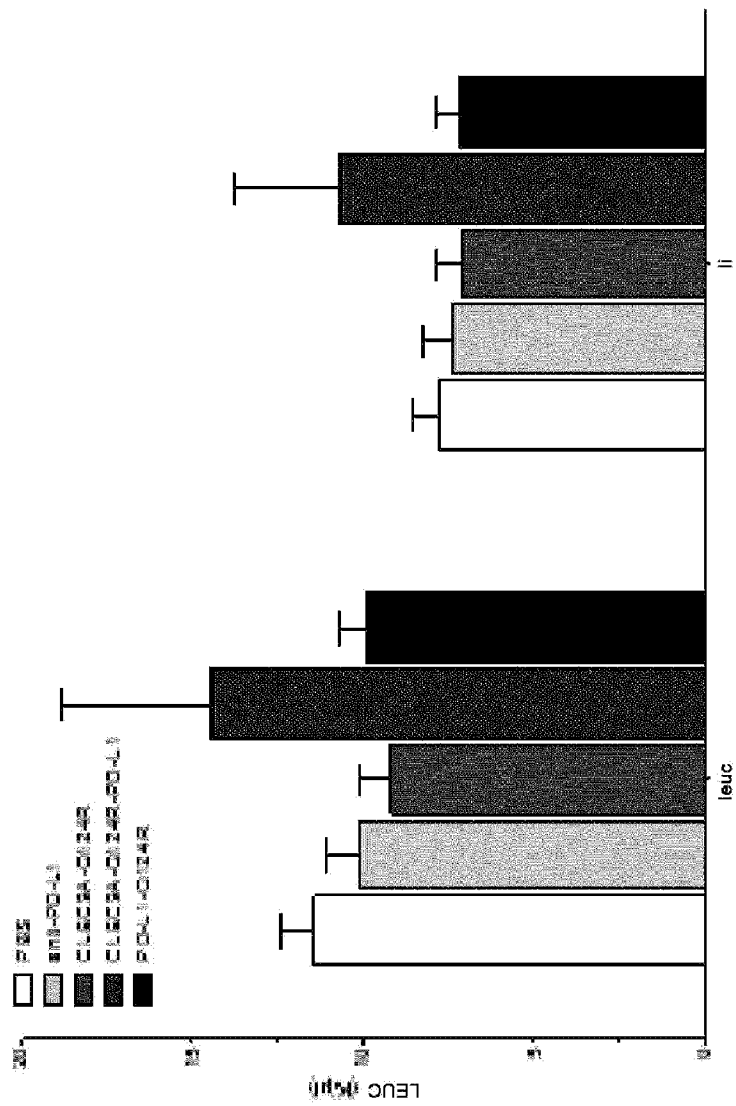


FIG. 4 (CONT.)
C.

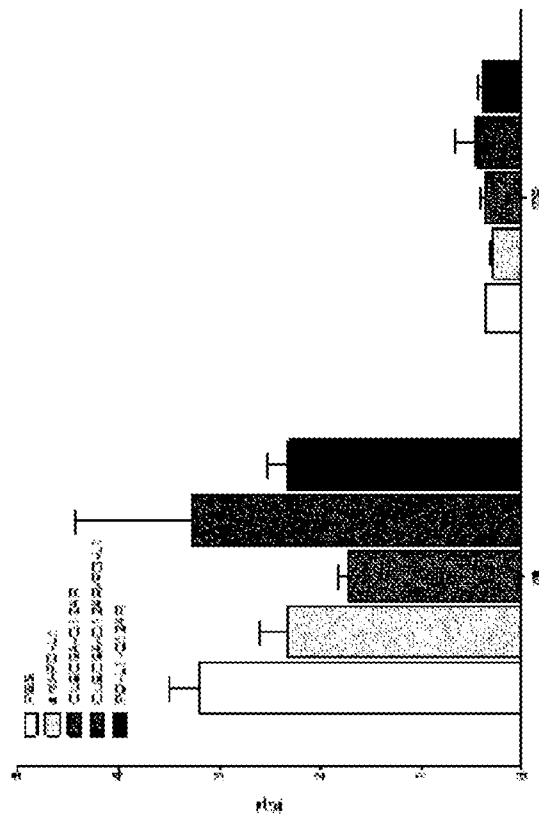


FIG. 4 (CONT.)
D.

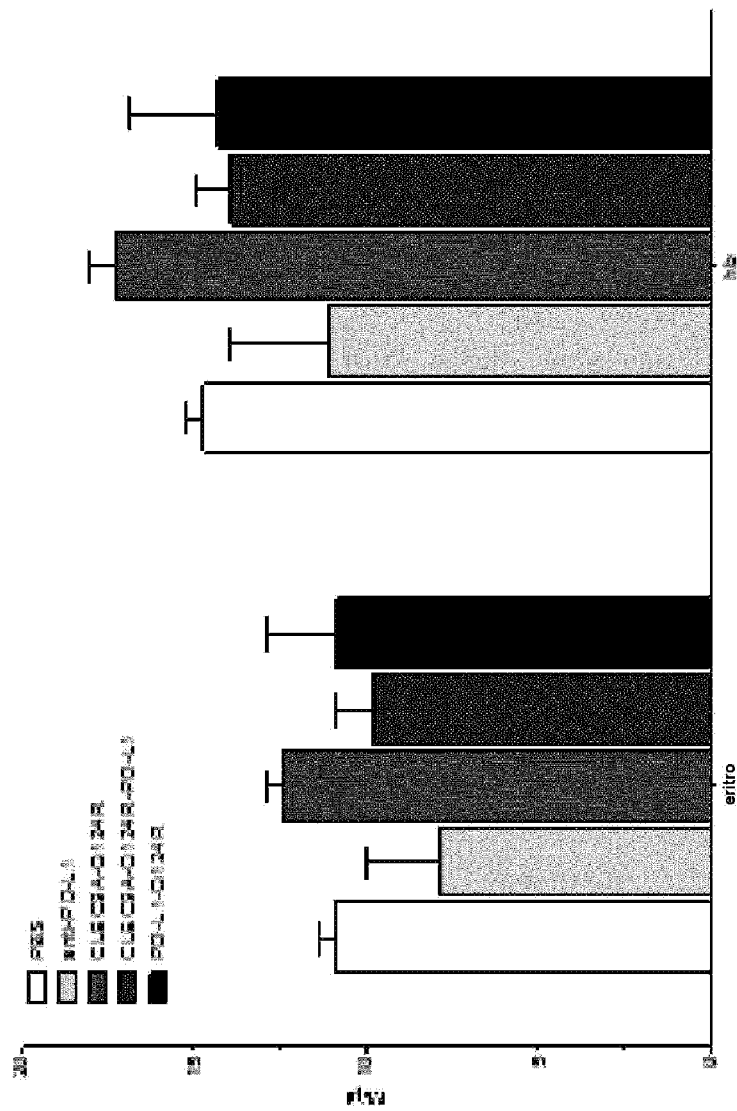


FIG. 4 (CONT.)
E.

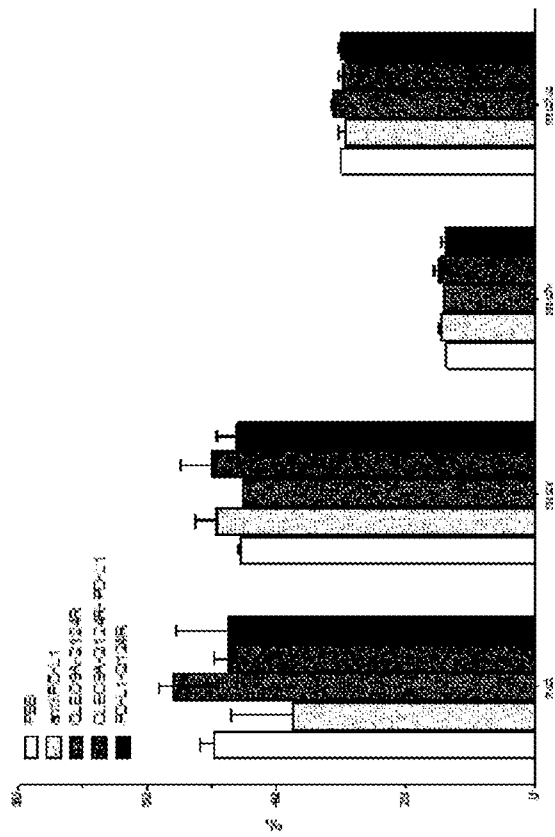


FIG. 4 (CONT.)
F.

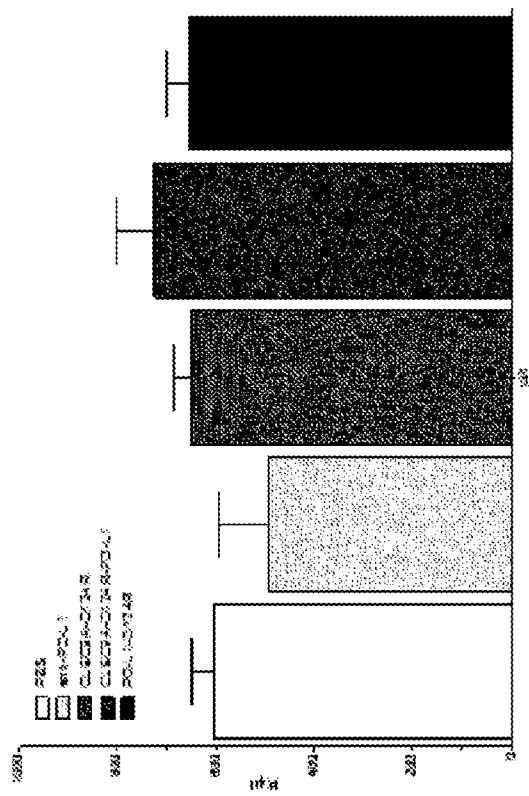


FIG. 4 (CONT.)
G.

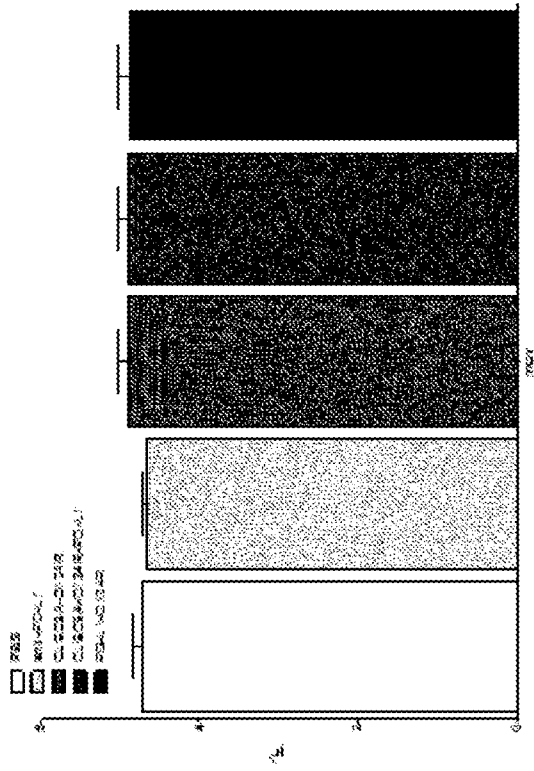


FIG. 5

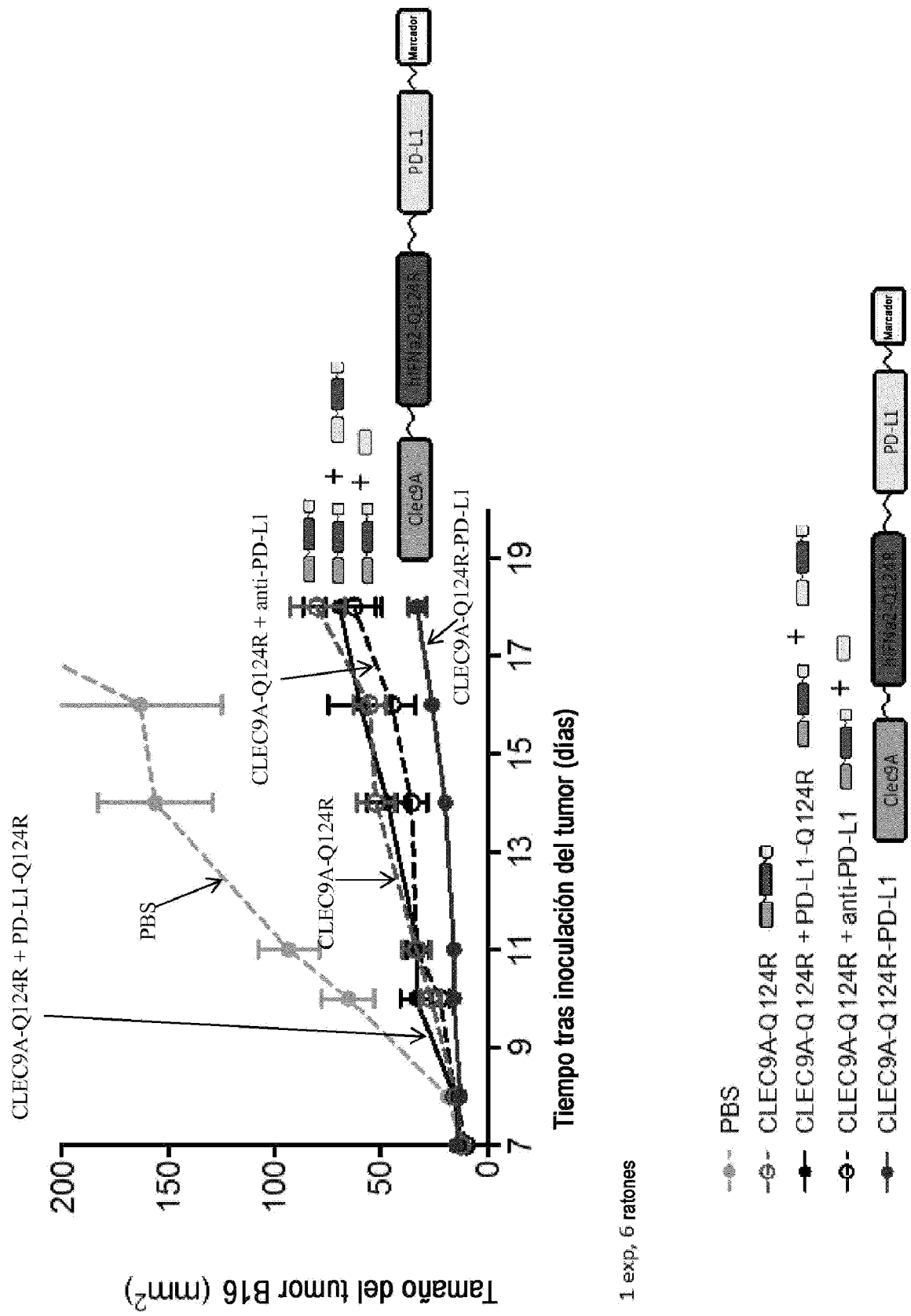


FIG. 6

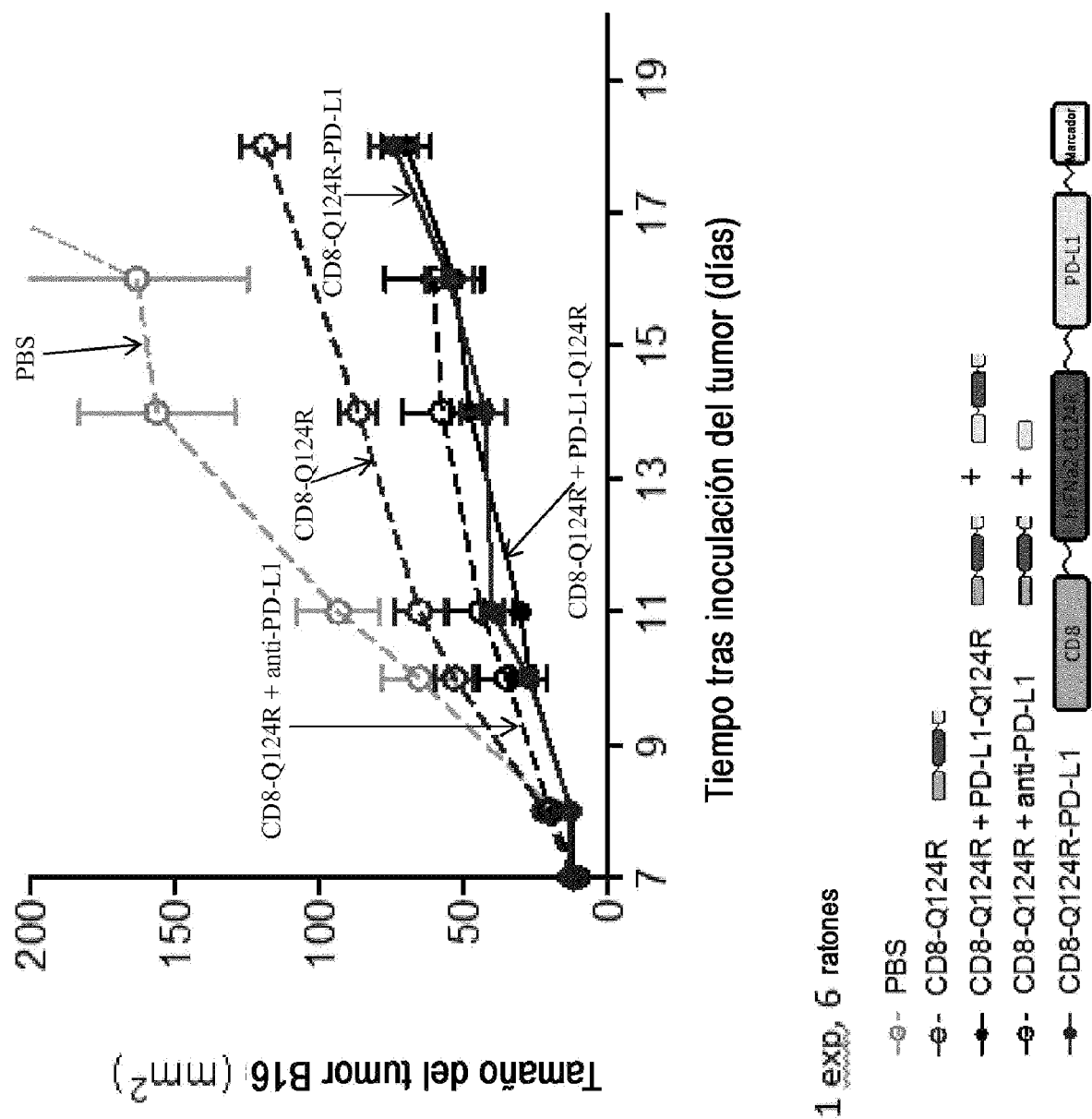


FIG. 7

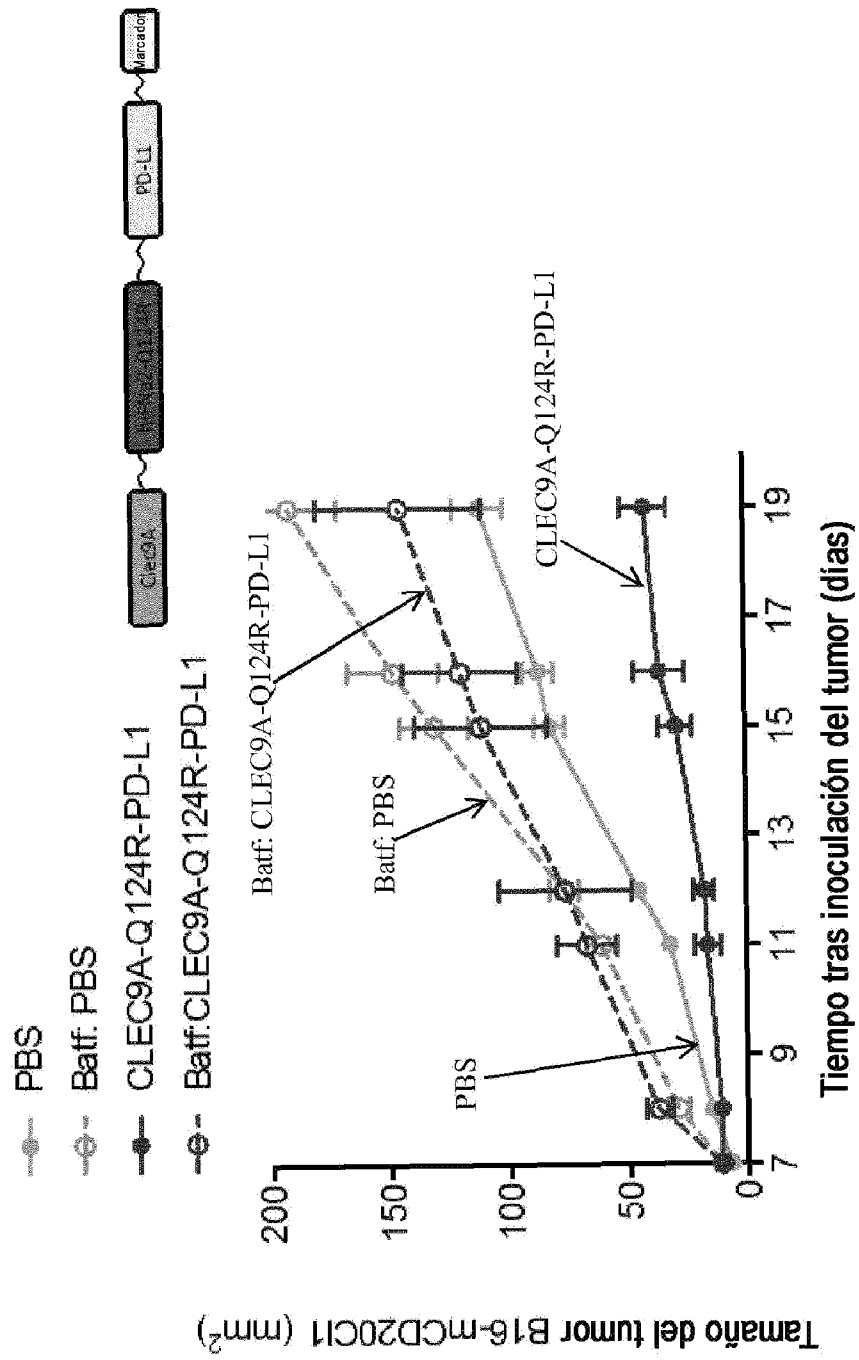


FIG. 8
A.

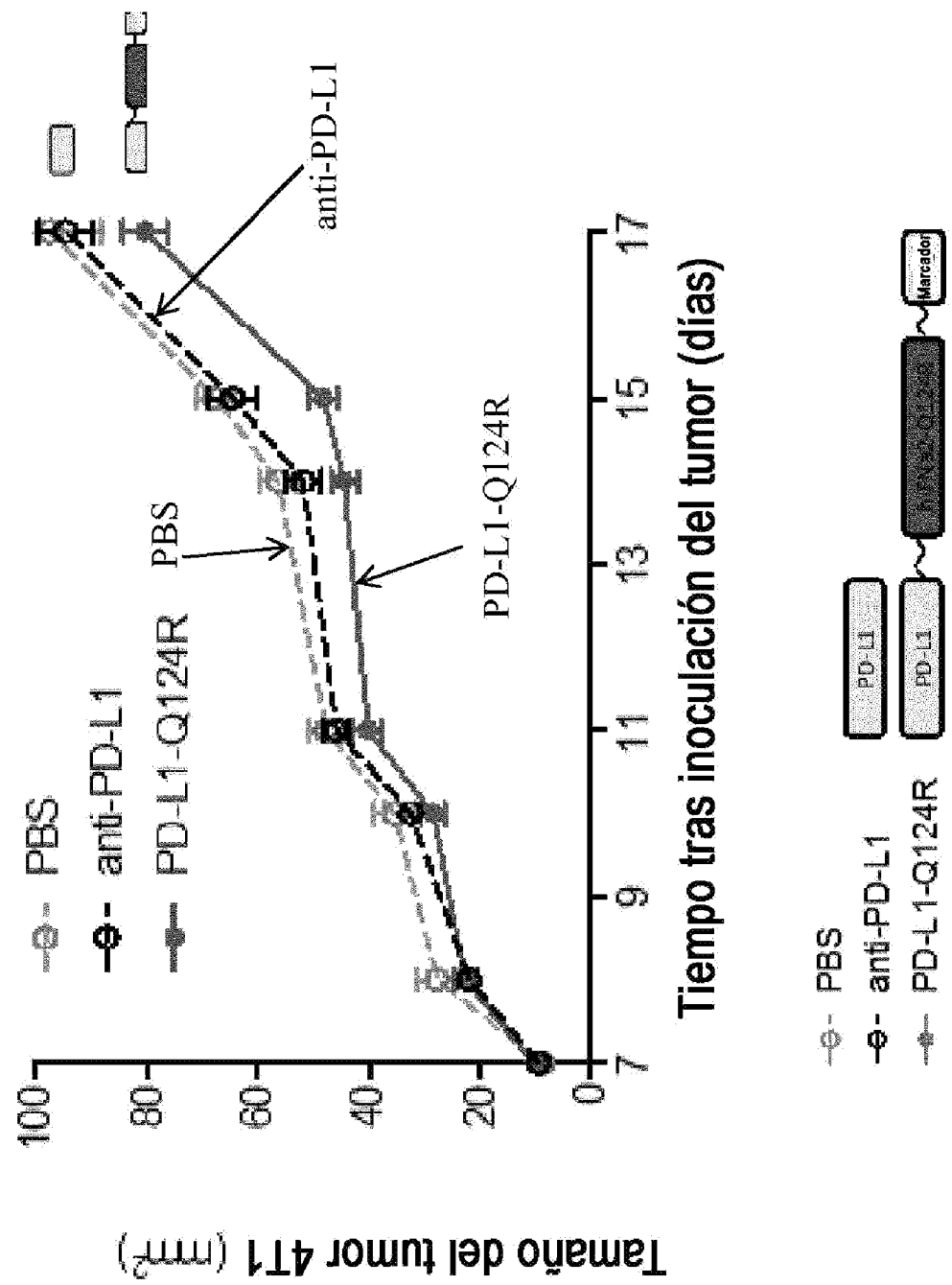


FIG. 8 (CONT.)
B.

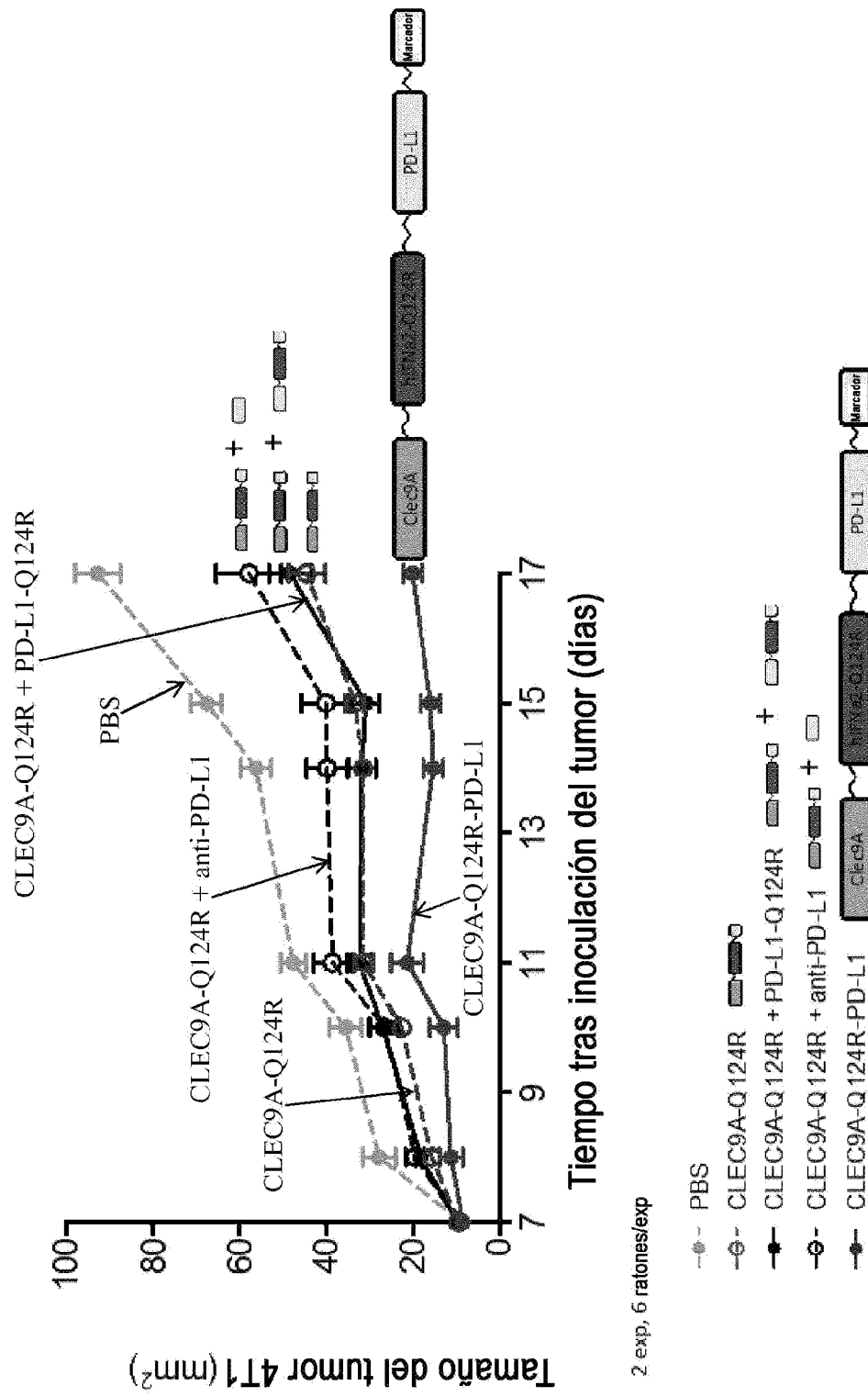


FIG. 8 (CONT.)
C.

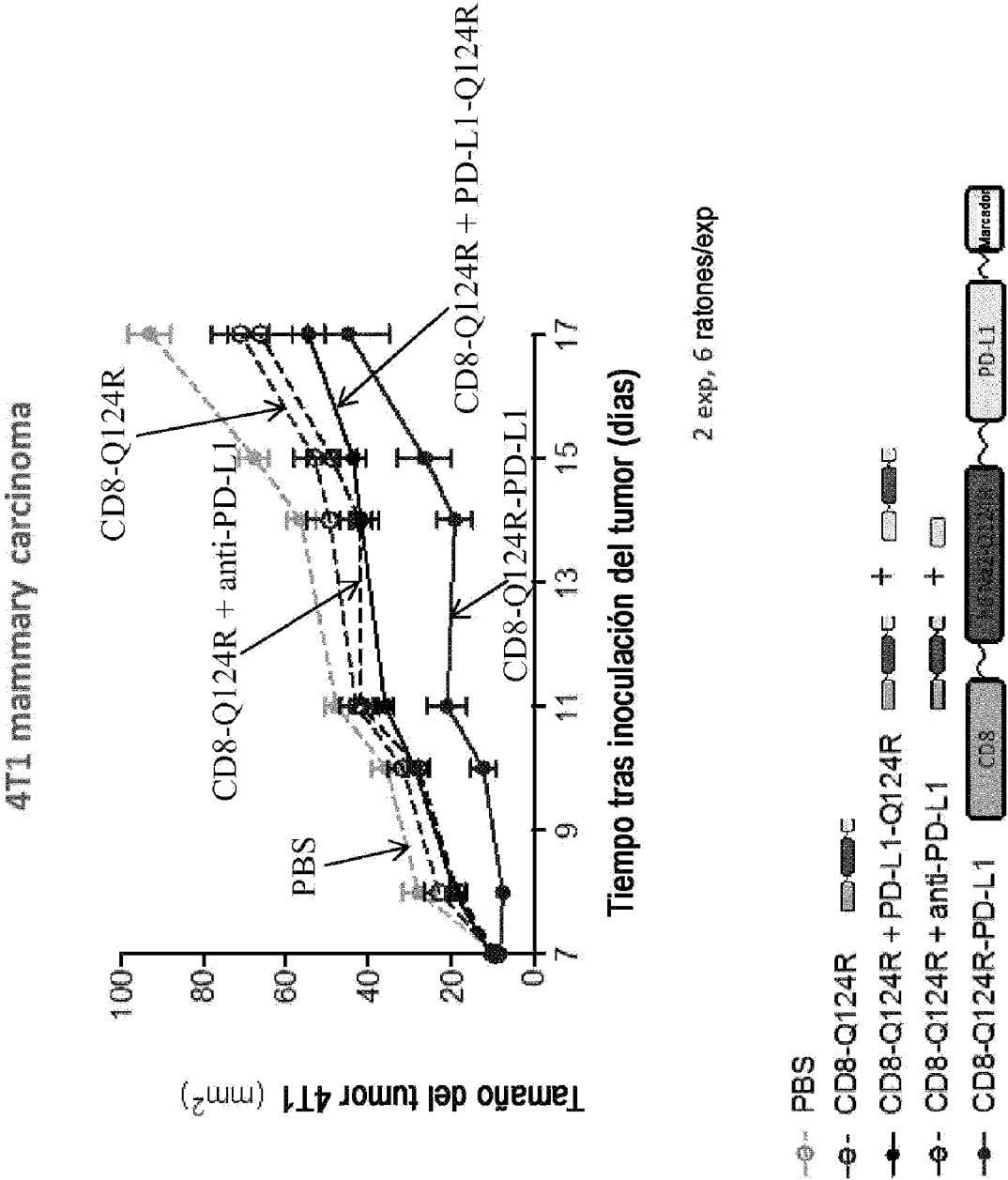


FIG. 9
A.

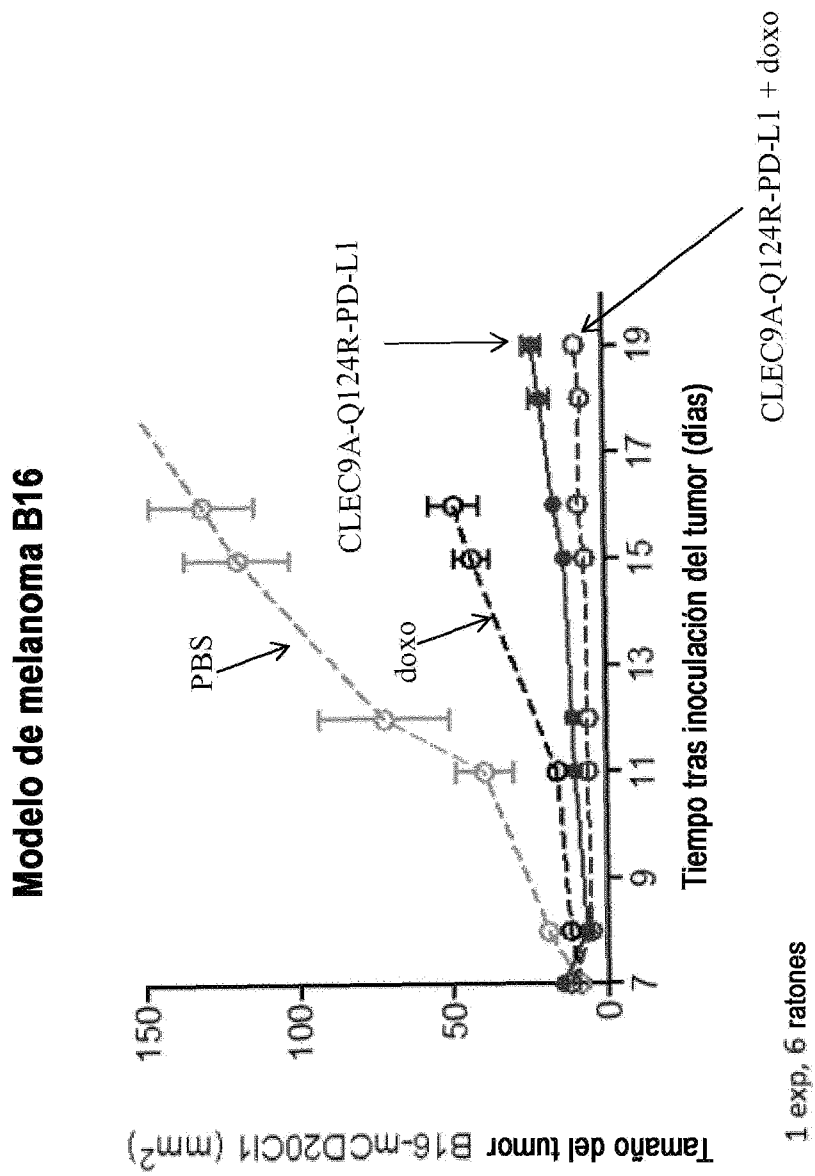


FIG. 9 (CONT.)

B.

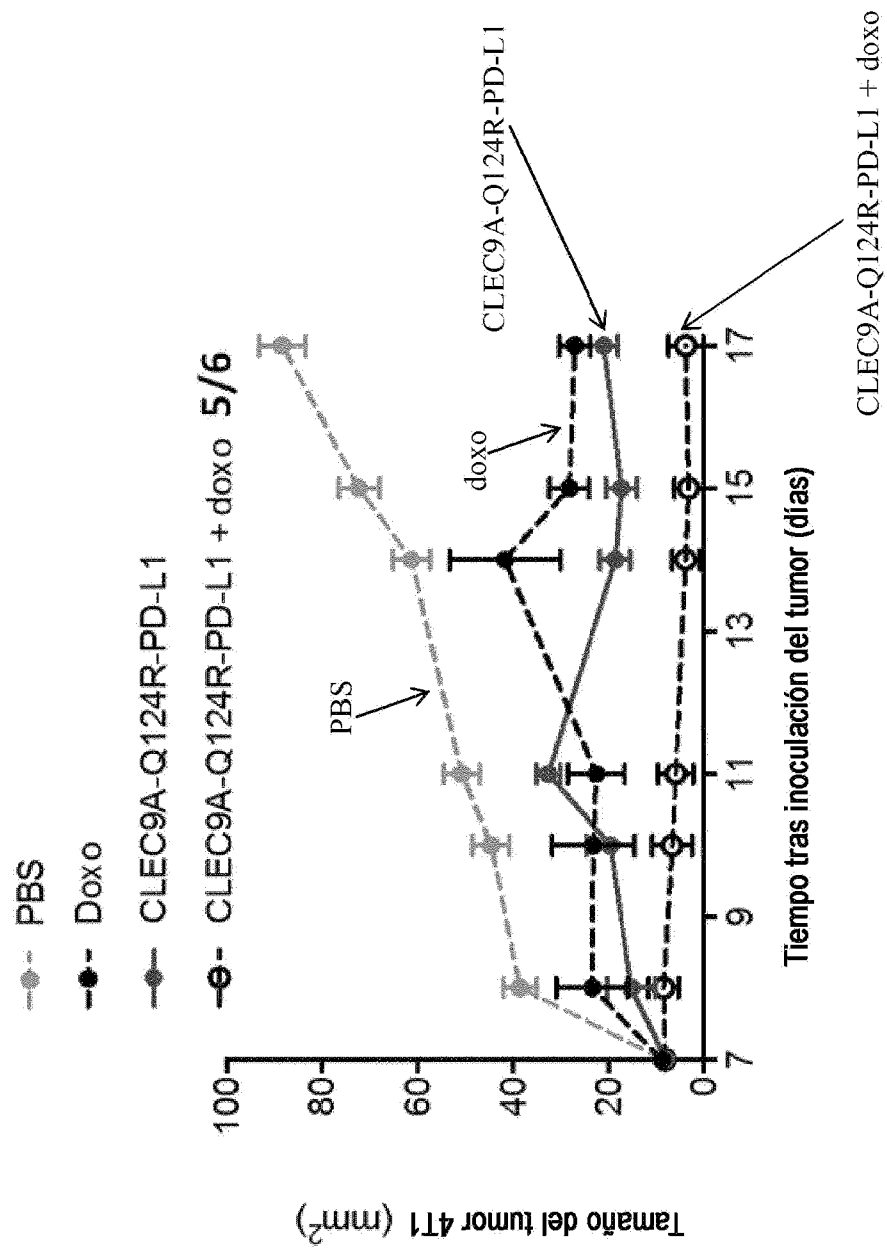


FIG. 9 (CONT.)

C.

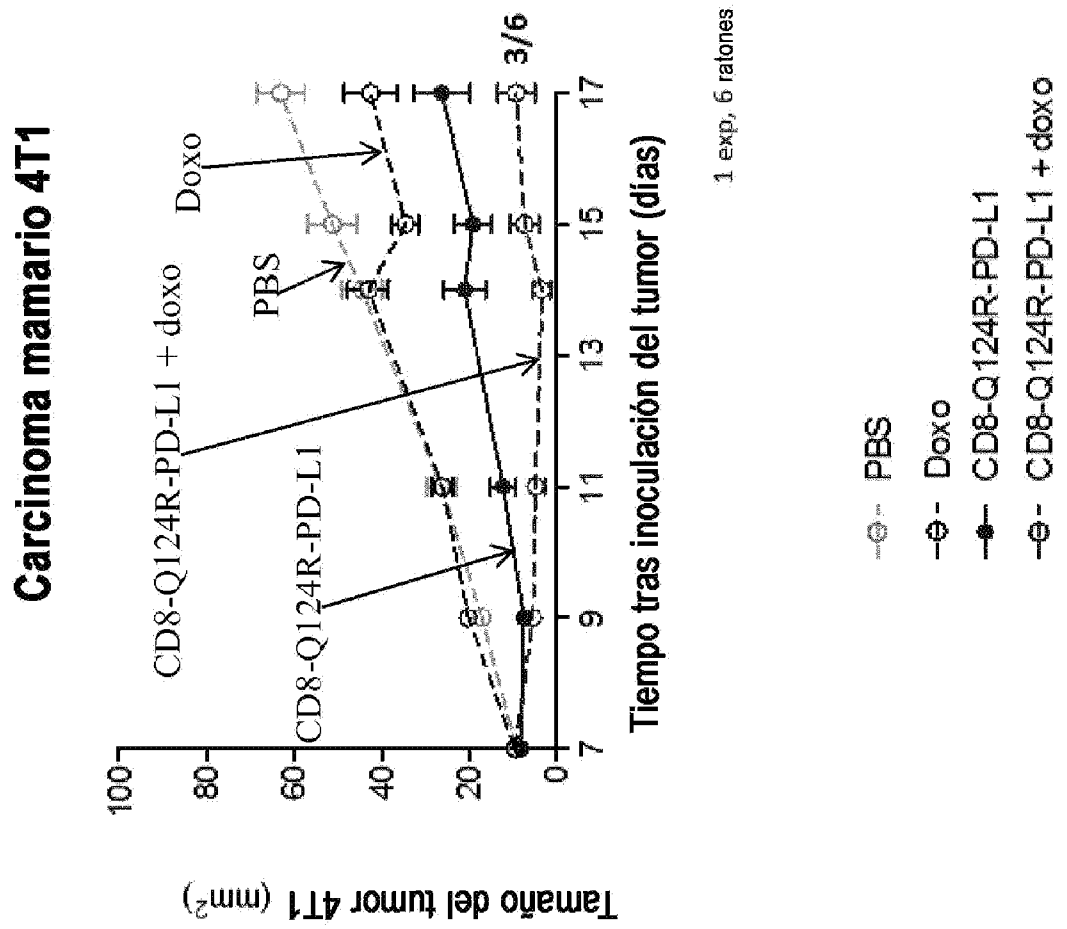


FIG. 10

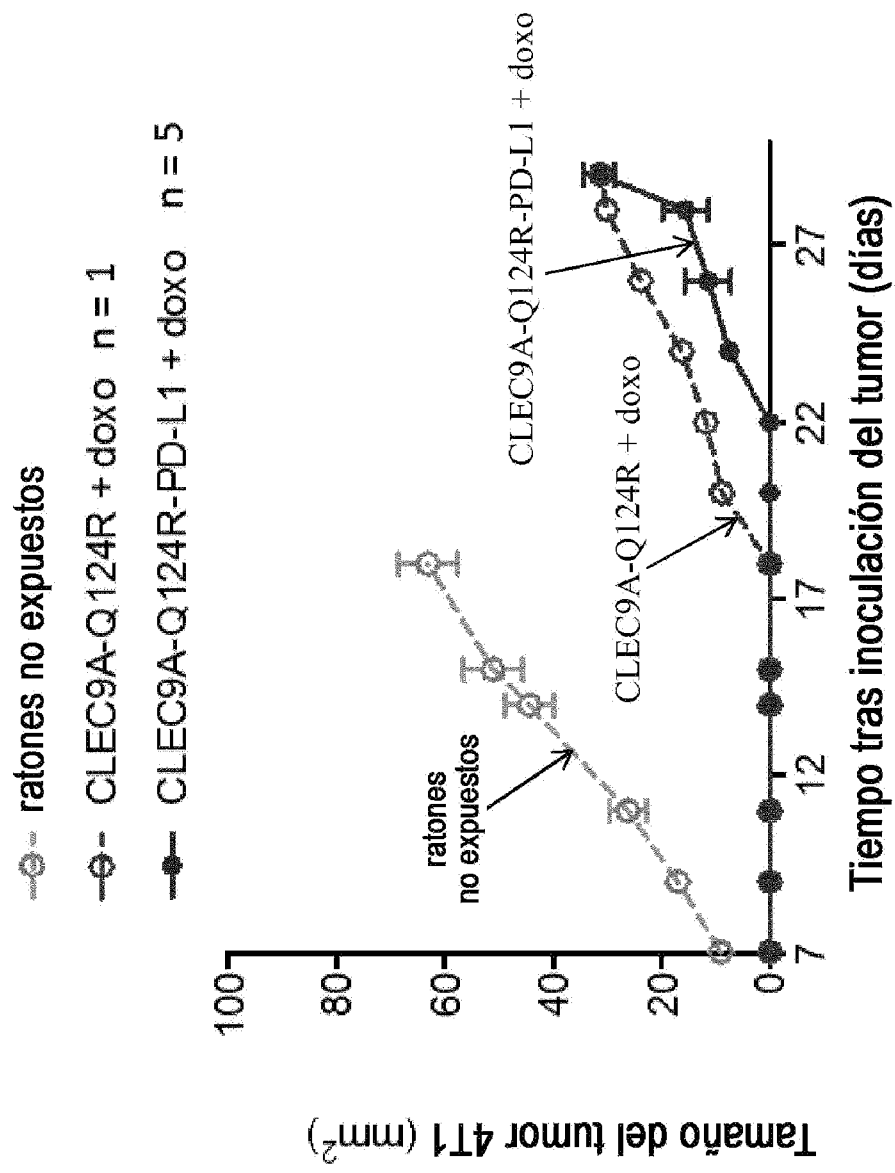
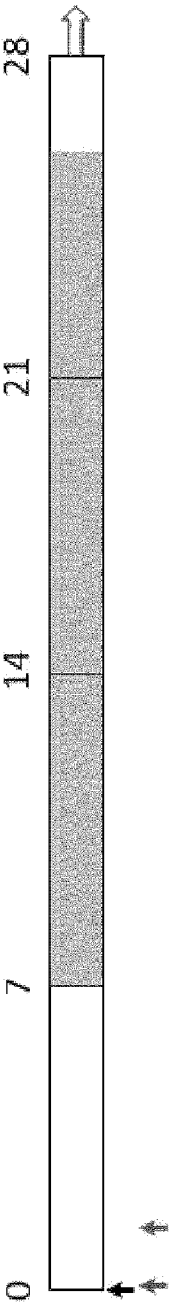


FIG. 11
A.



→ d0 = inyección sc MOG_{AA35-55} + CFA/mtb + ip toxina Pertussis
→ d2 = ip PT
→ Tratamientos diarios día 7-25, ip

Puntuación diaria:	
0-1	diversos grados de cola menos horizontal si el ratón se sostiene por el cuello
1,5	cola flácida (totalmente vertical), pero todavía con un poco de tensión
2	cola totalmente flácida
2,5	+ patas traseras cerradas (los dedos ya no se extienden)
3	+ andares de pato (pero todavía usando ambas patas traseras) = ataxia, debilidad
3,5	ya no usa una pata trasera (= parálisis) o está empezando la parálisis en ambas patas
4	ambas patas traseras completamente paralizadas
4,5	+ ya no puede darse la vuelta si se le coloca boca arriba
5	moribundo y/o parálisis de las patas delanteras
6	muerto

FIG. 11 (CONT.)

B.

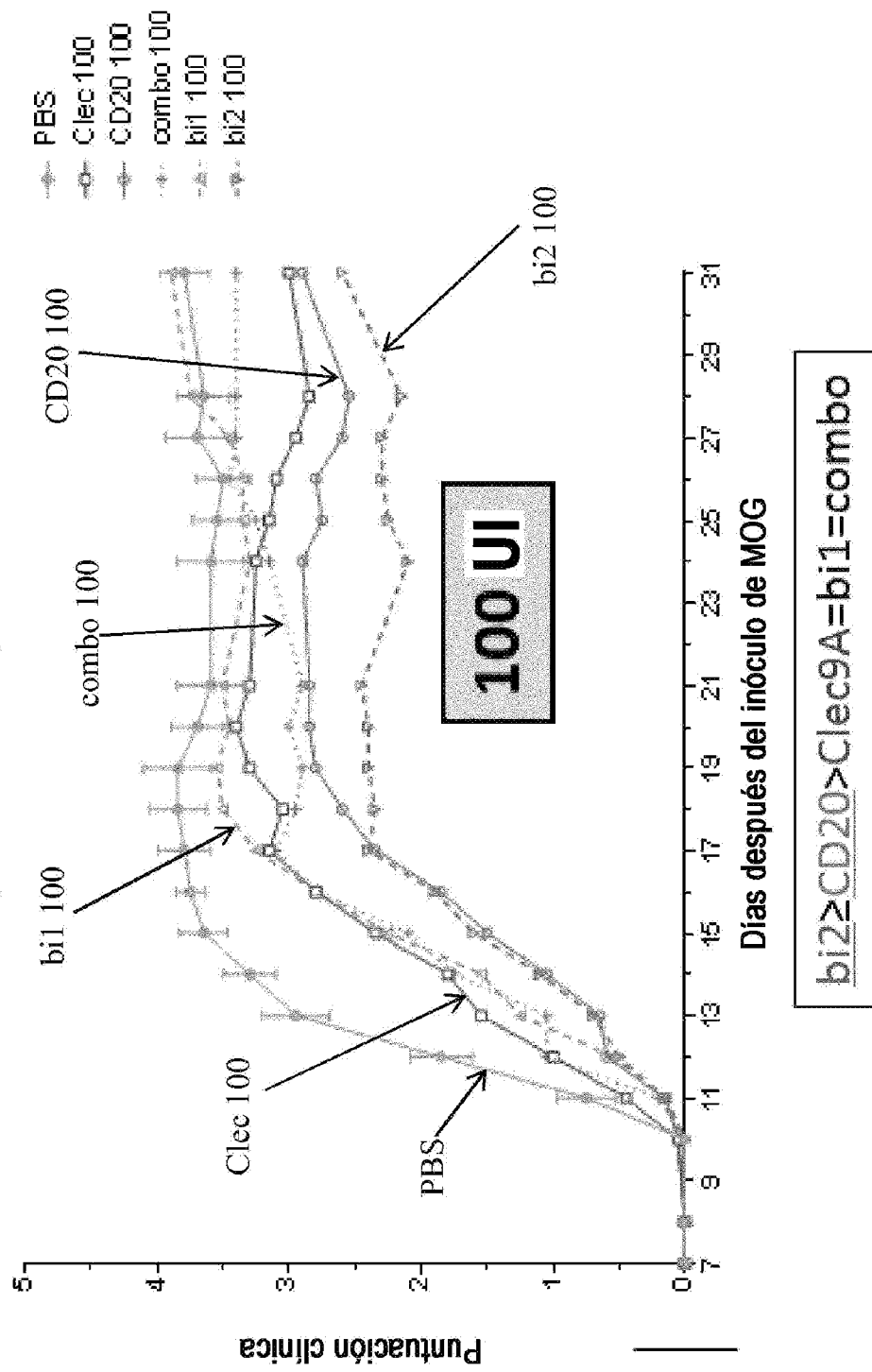


FIG. 11 (CONT.)

C.

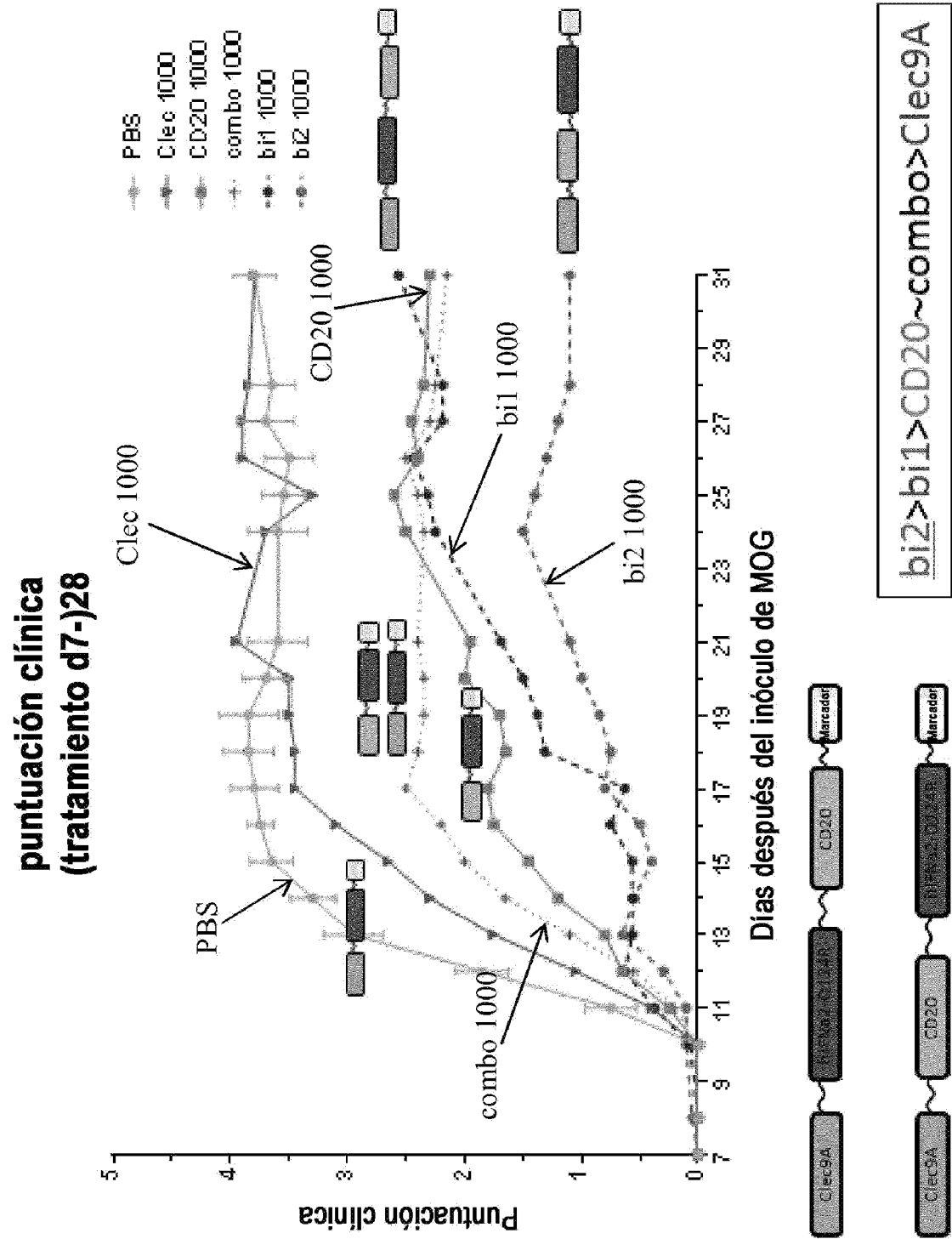


FIG. 11 (CONT.)

E.

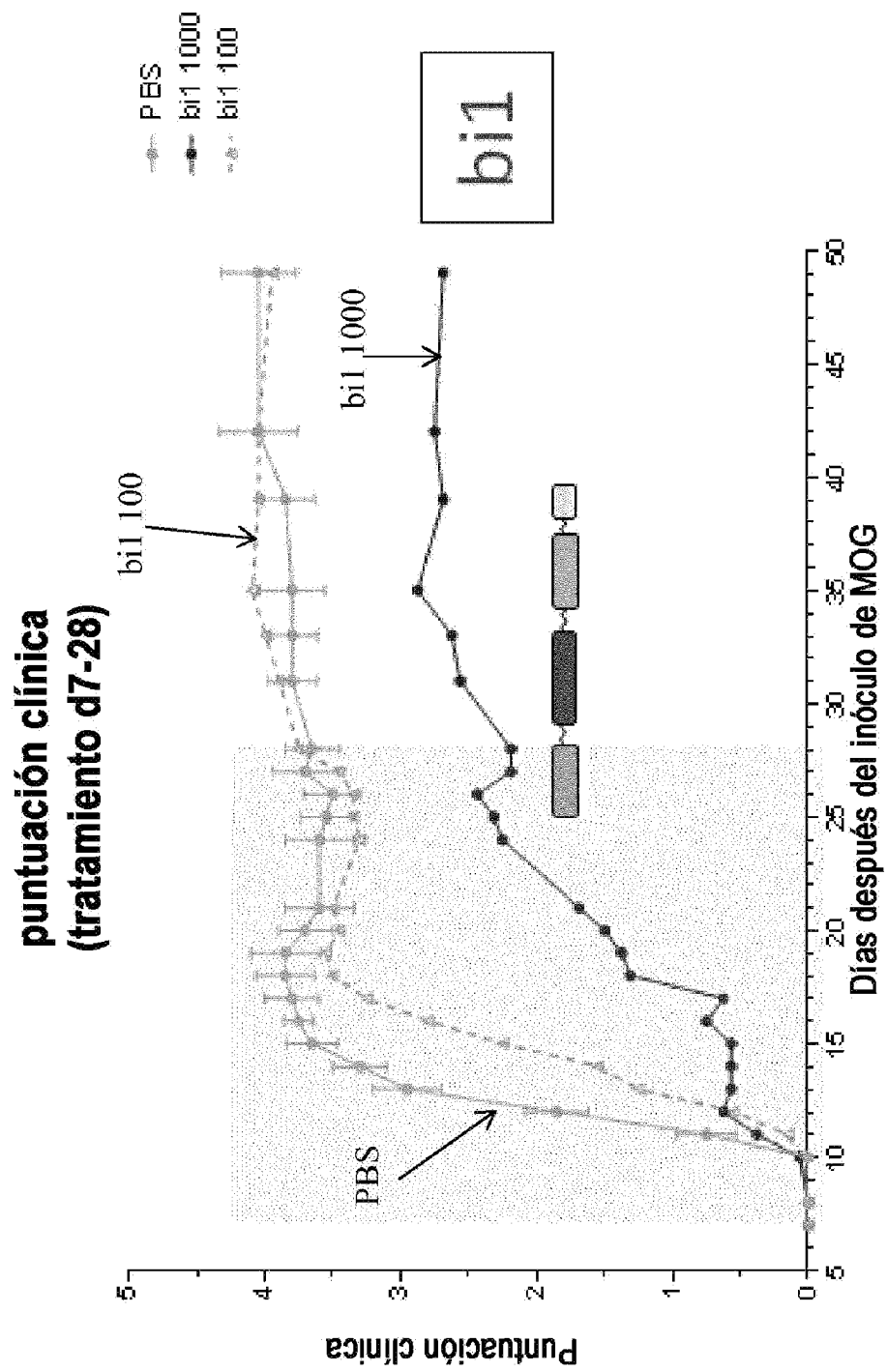


FIG. 11 (CONT.)

F.

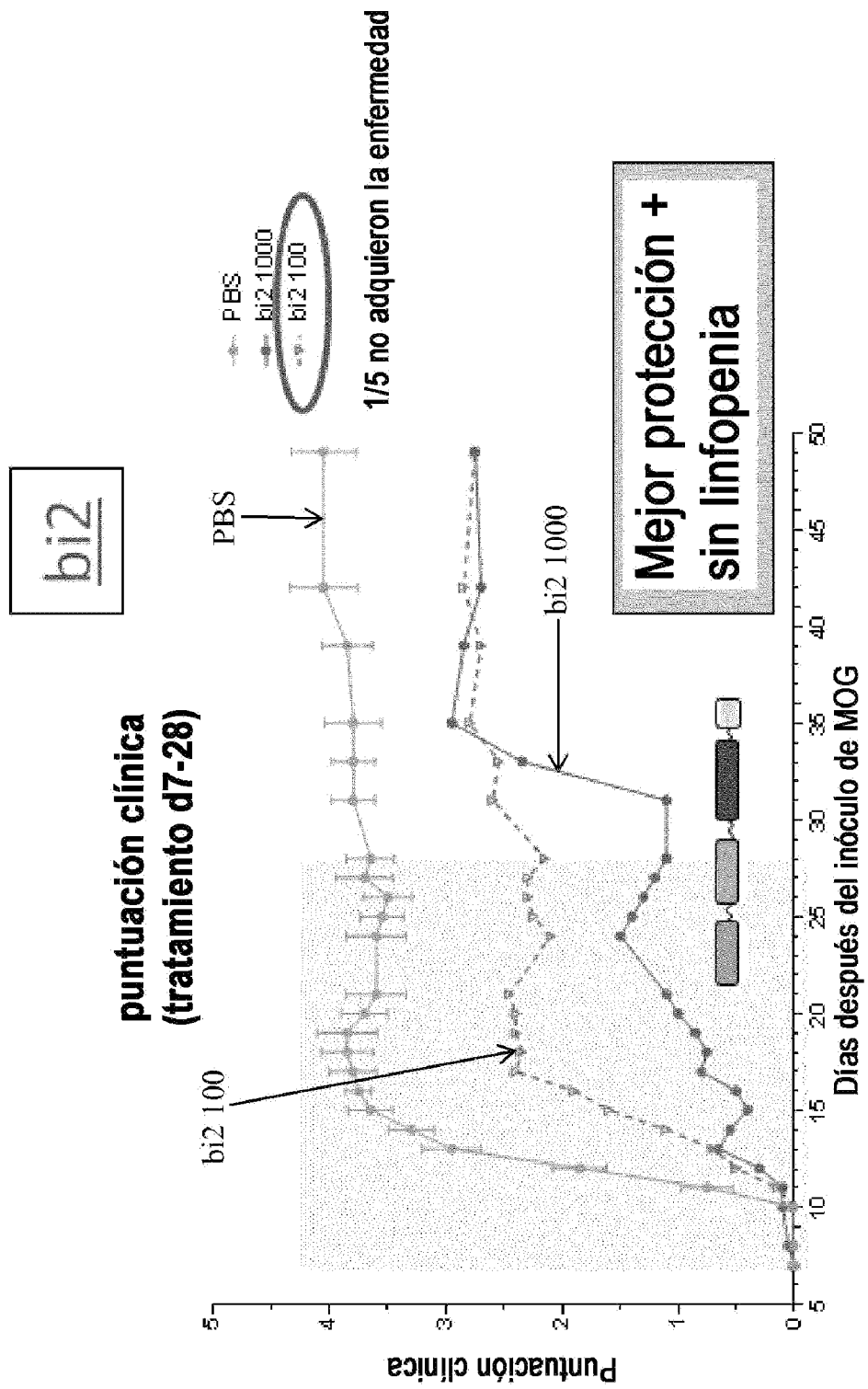


FIG. 12

A.

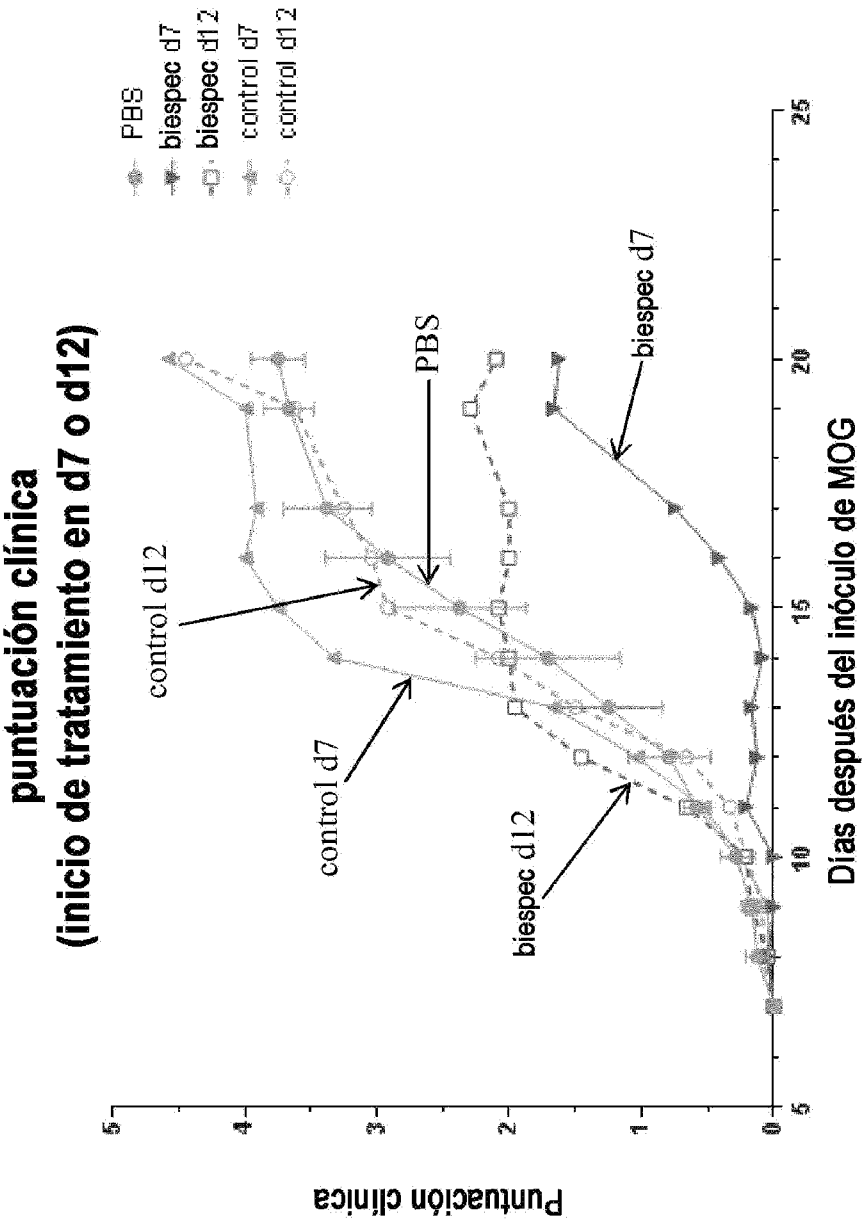


FIG. 12

B.

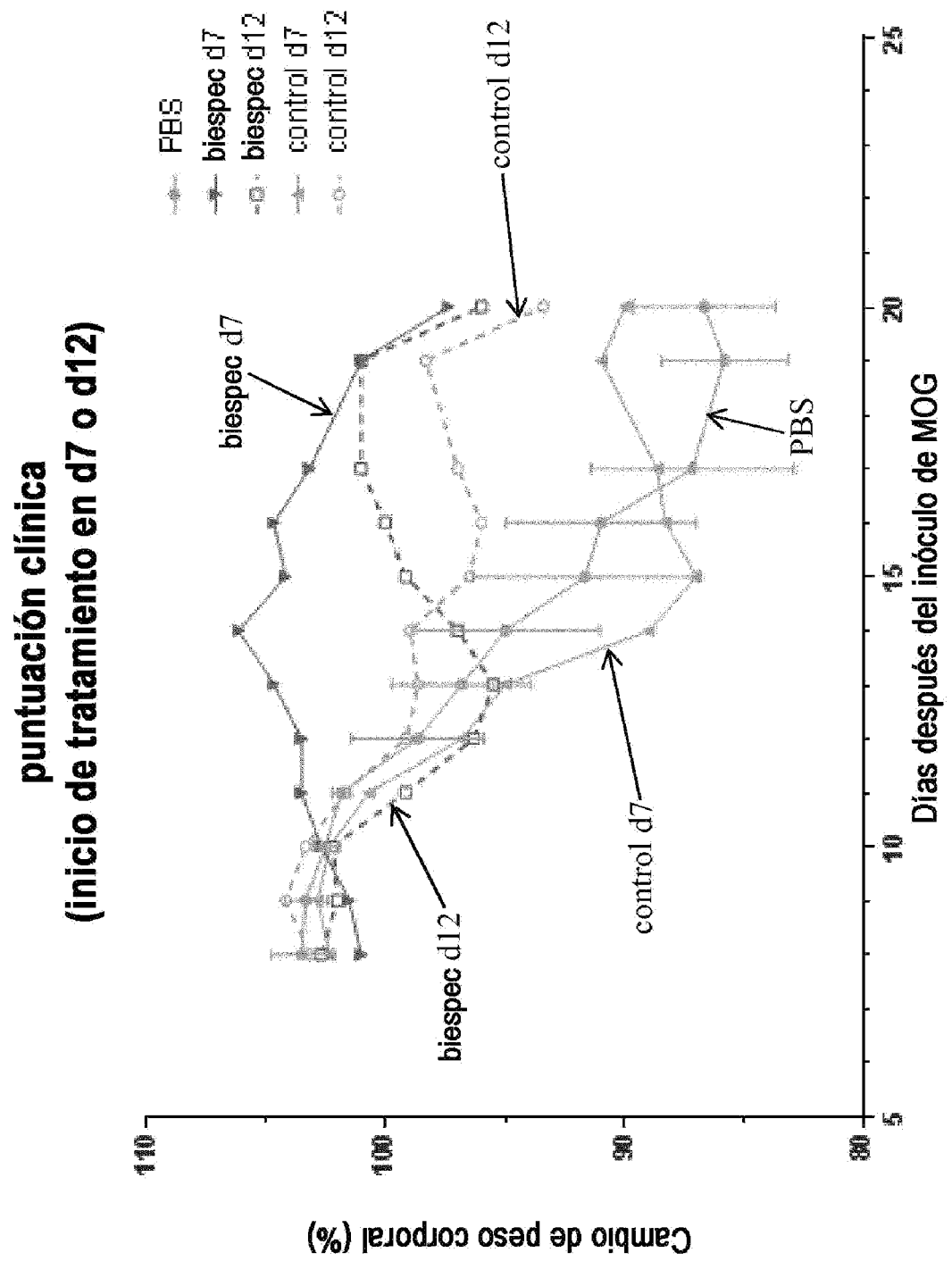


FIG. 12

C.

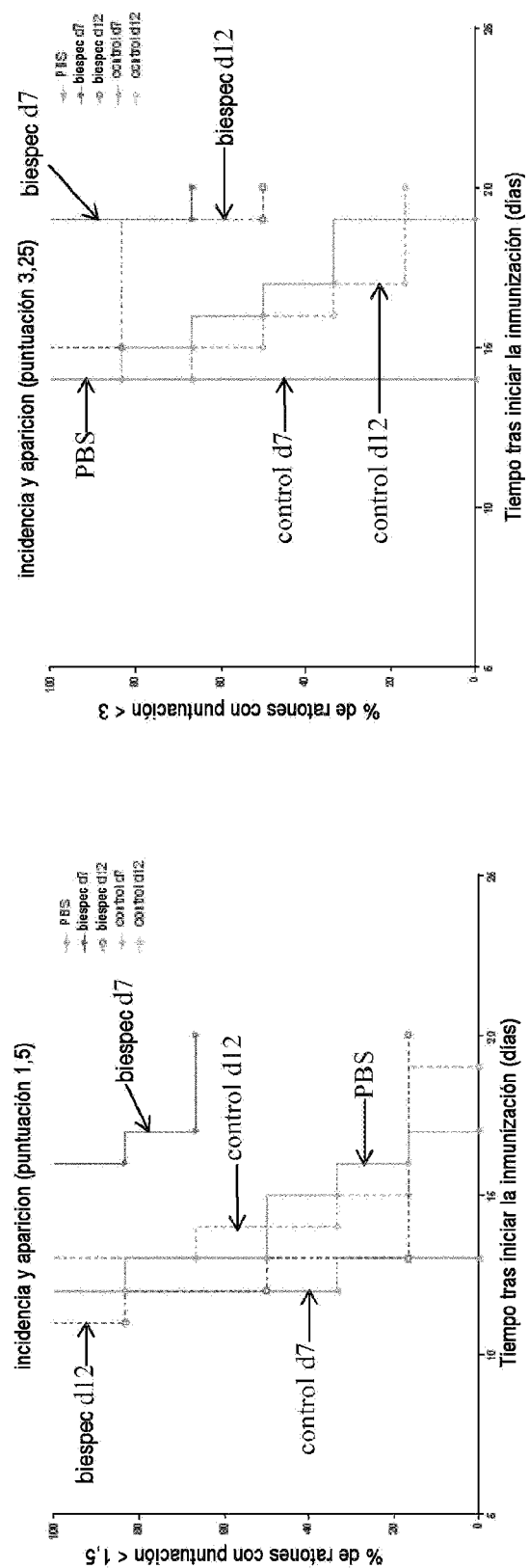
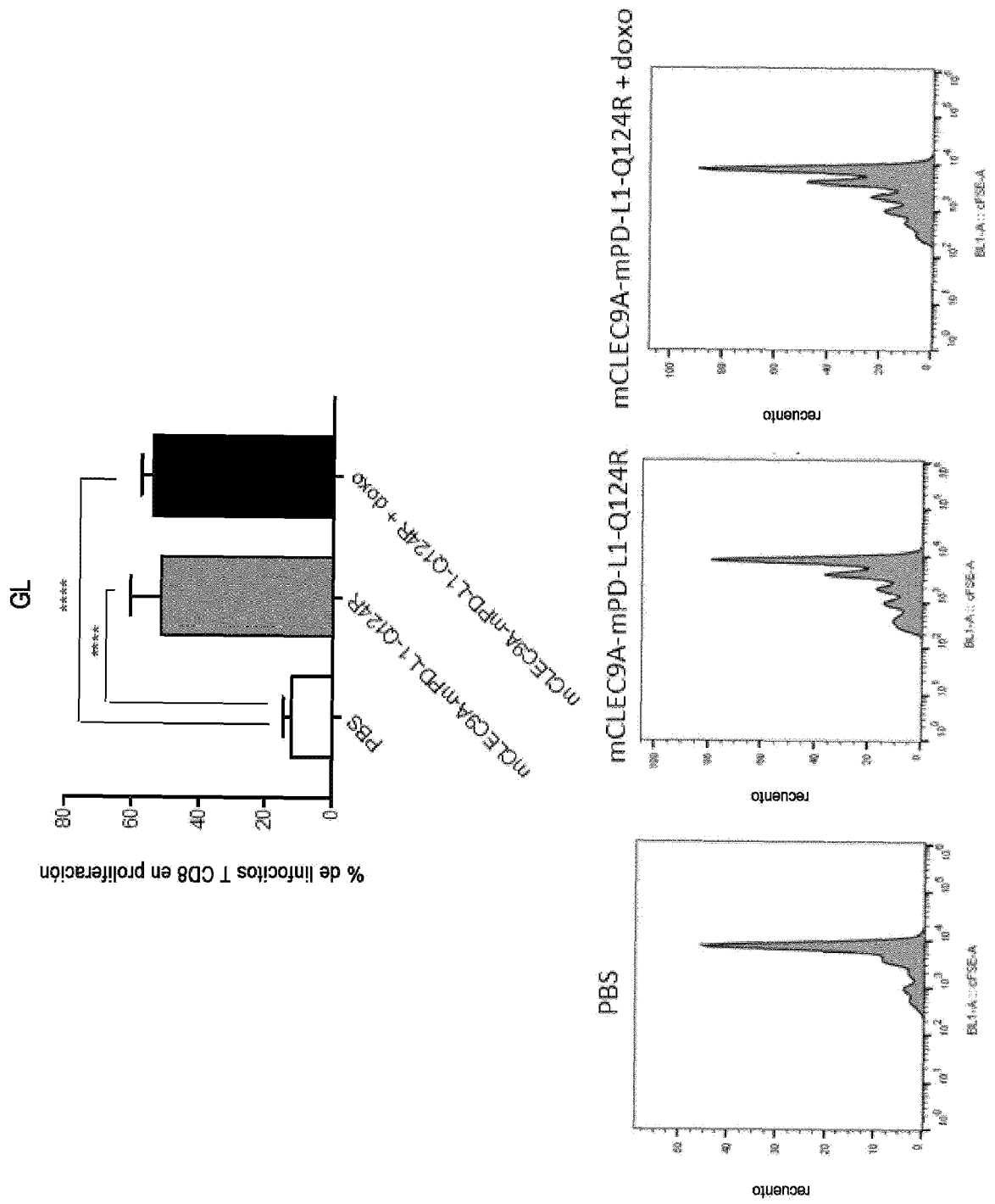


FIG. 13
A.



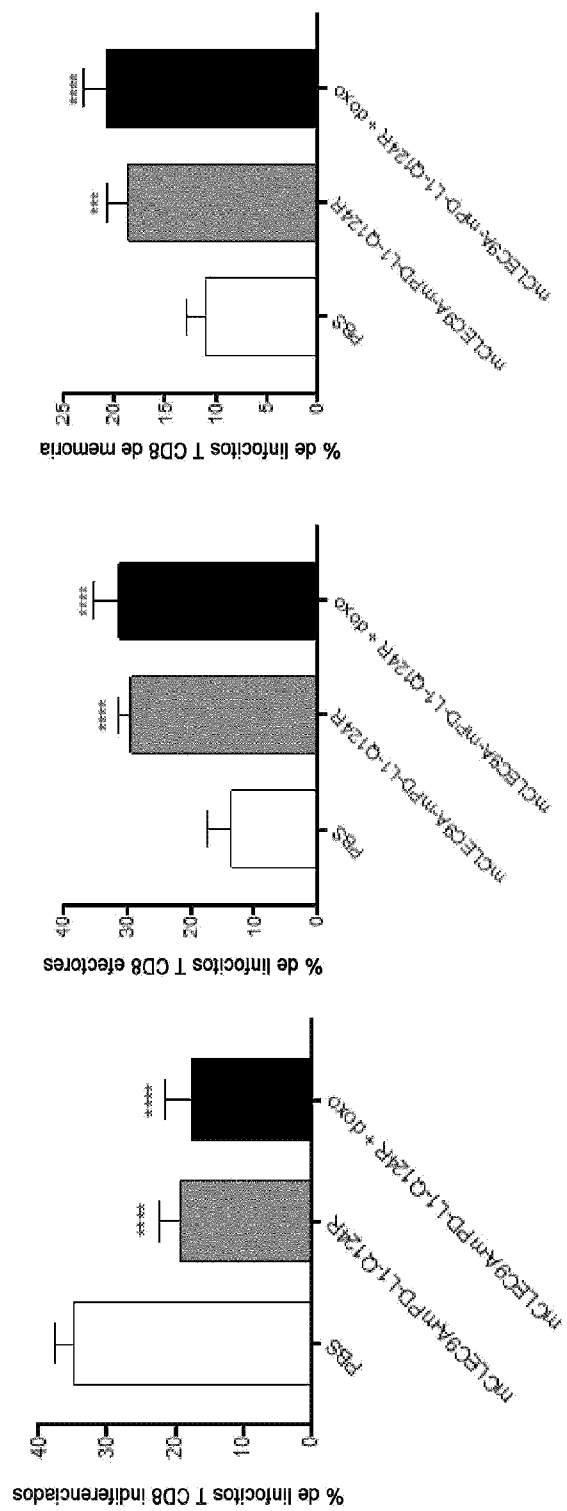


FIG. 13 (CONT.)
B.

FIG. 13 (CONT.)
C.

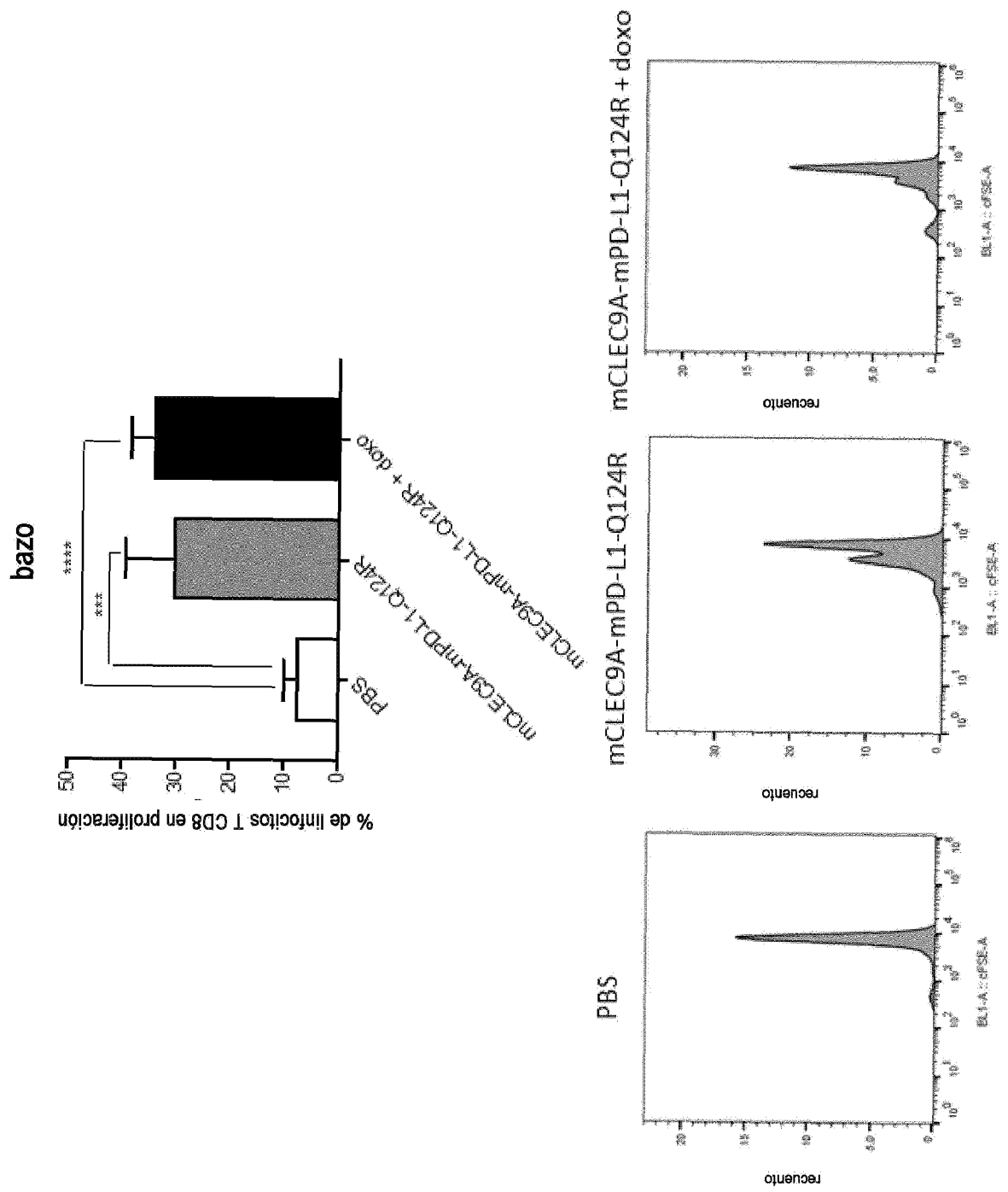
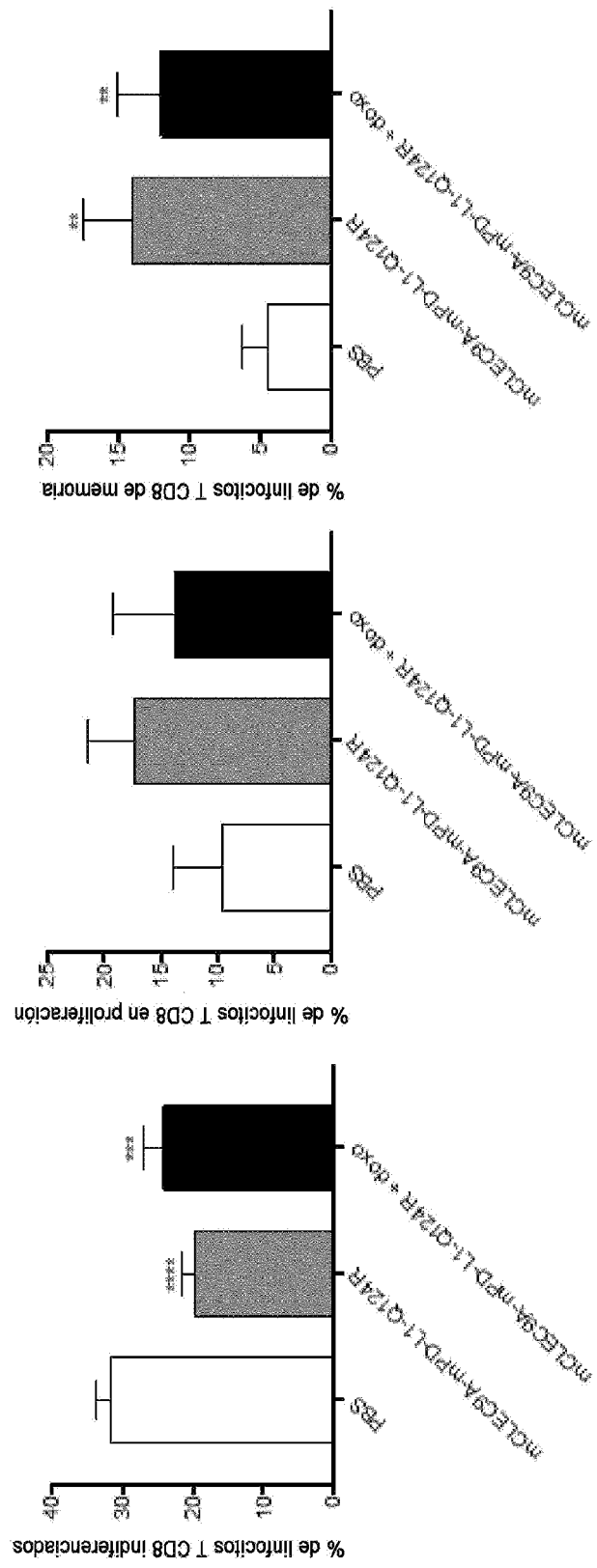


FIG. 13 (CONT.)
D.



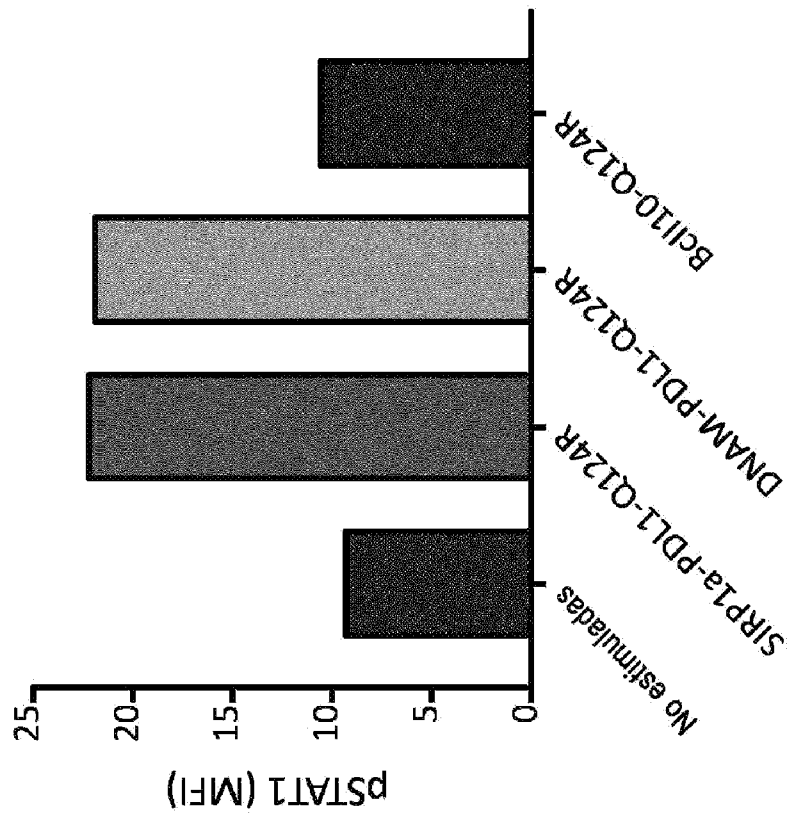


FIG. 14

FIG. 15

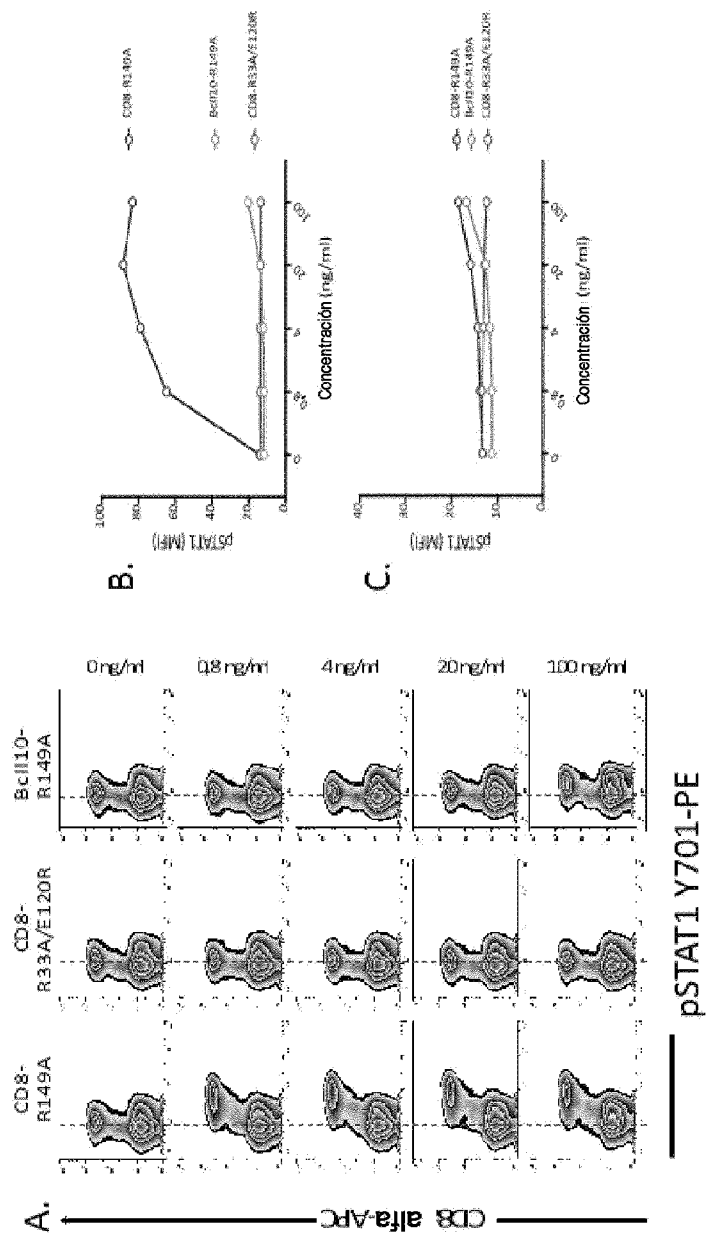
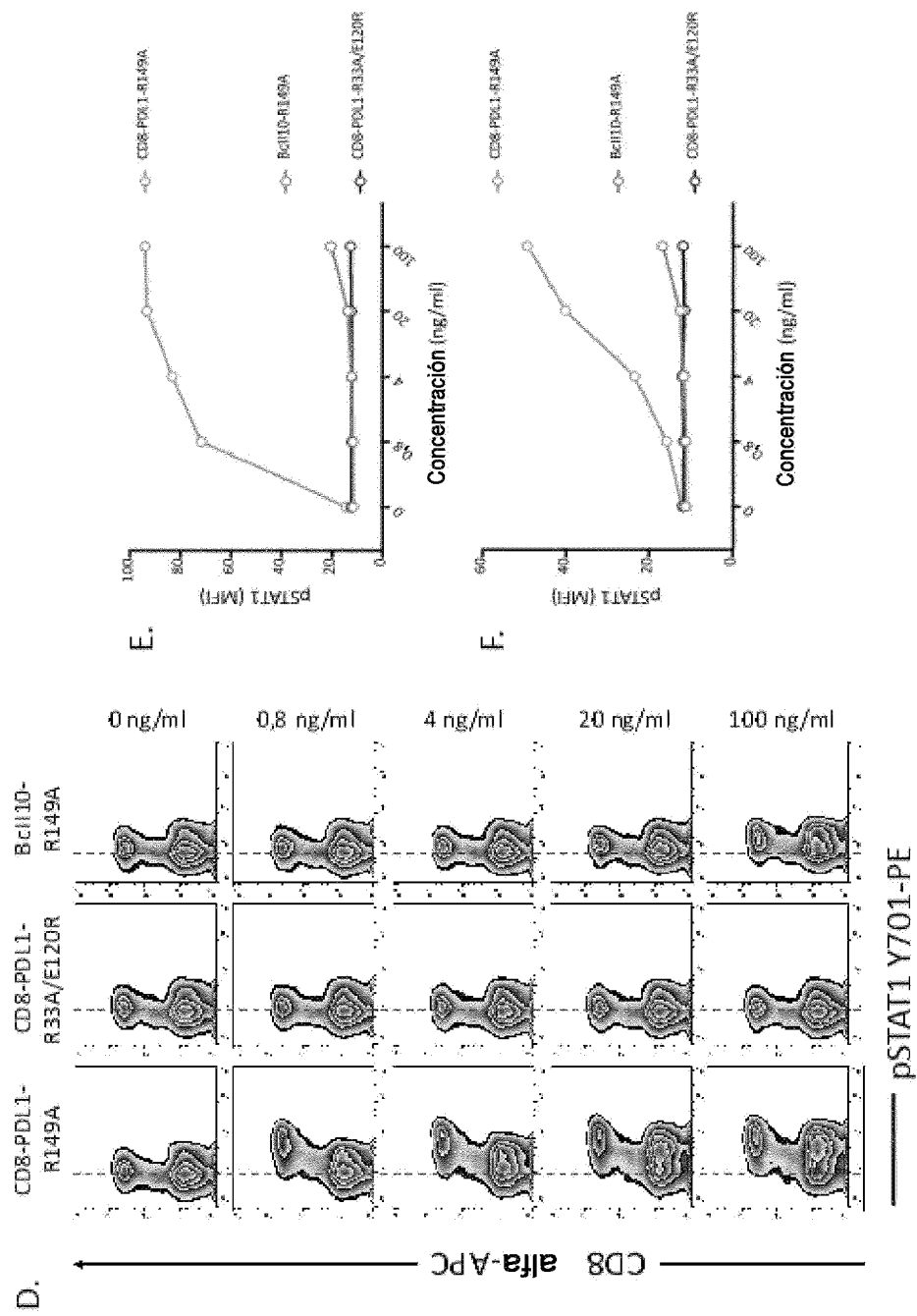


FIG. 15 (CONT.)



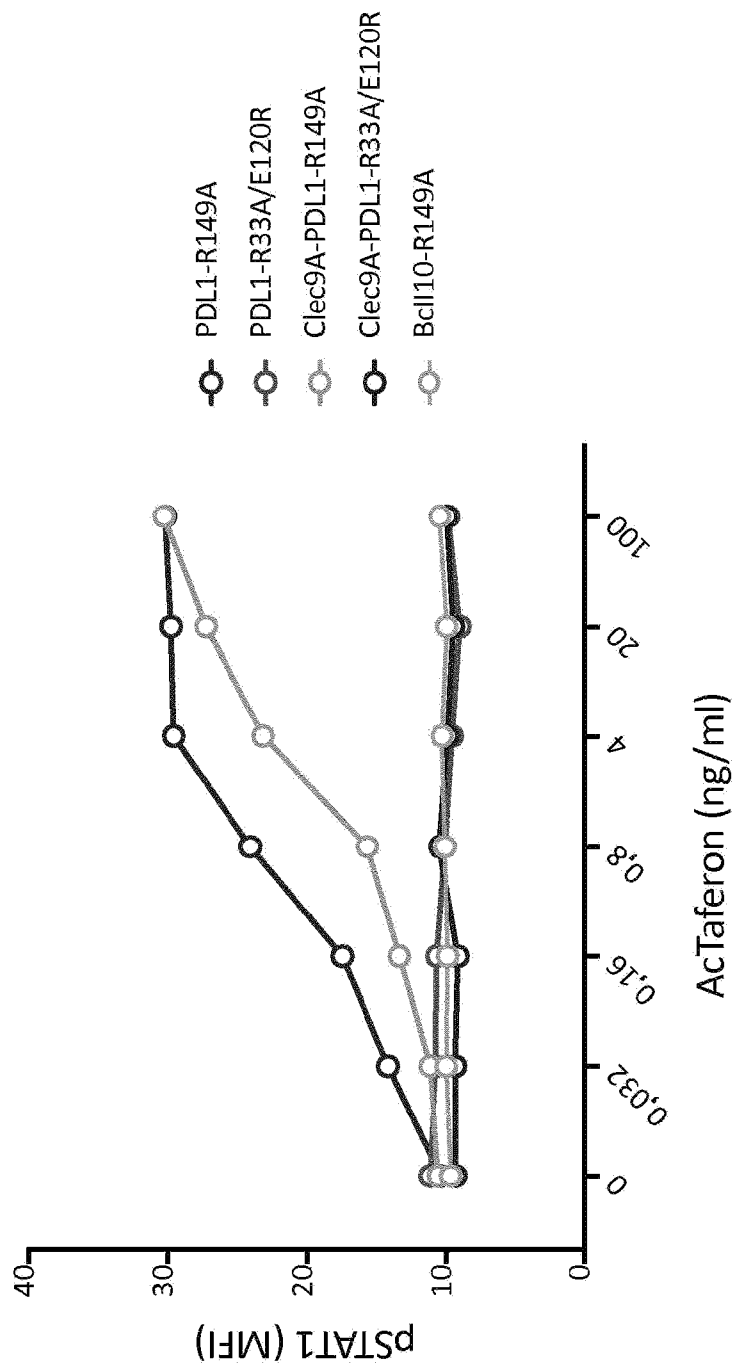


FIG. 16

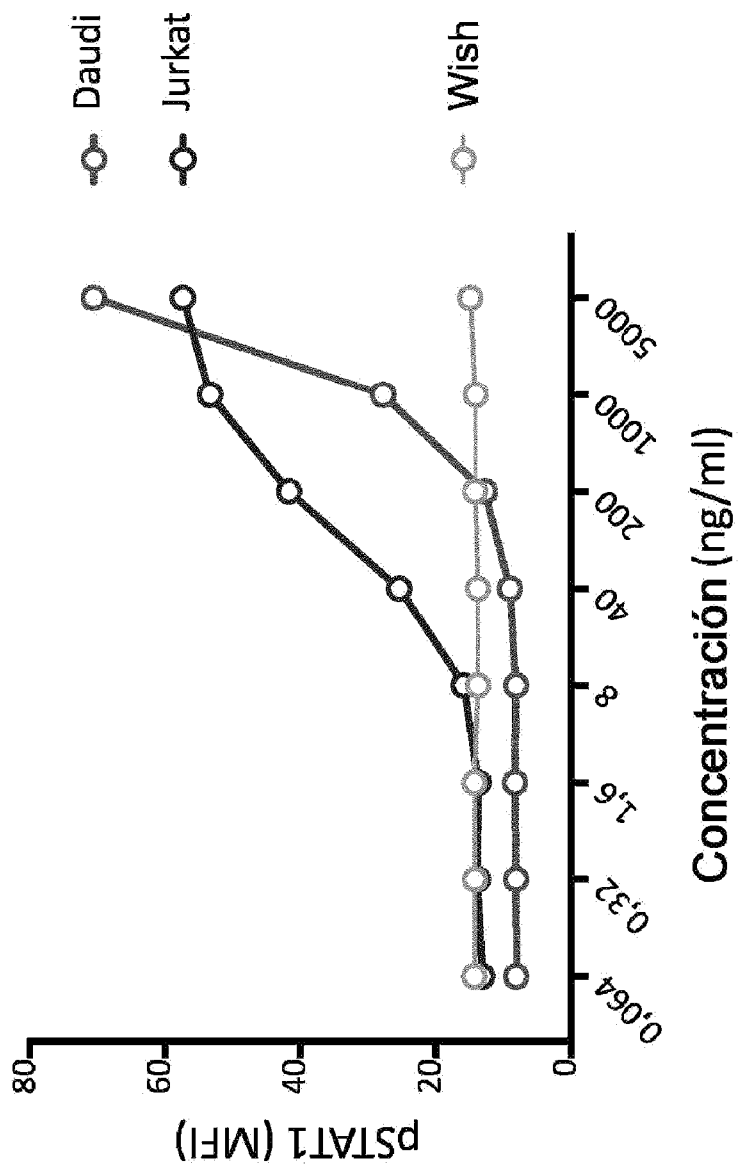


FIG. 17

FIG. 18

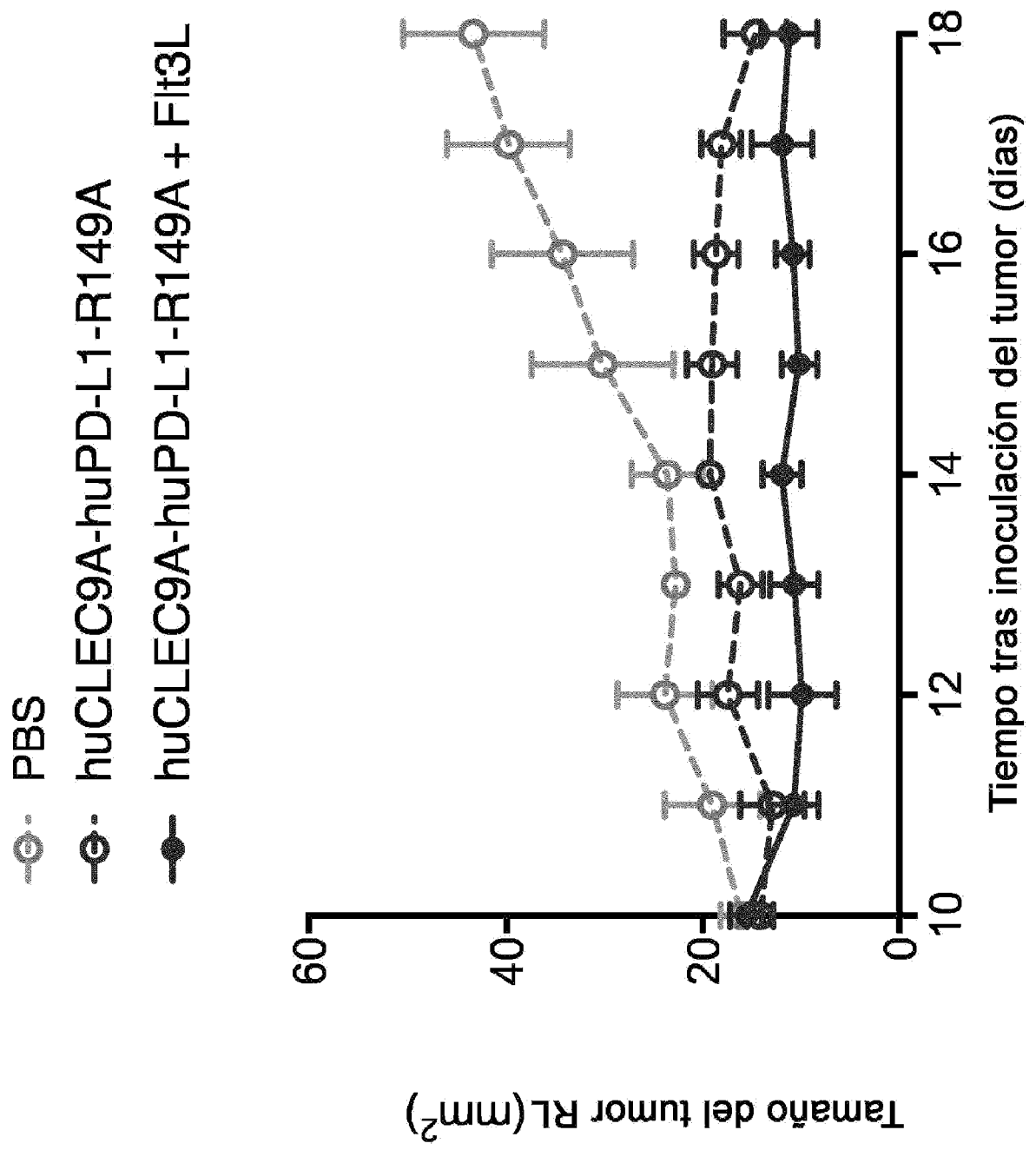


FIG. 19

