

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 912**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.1998 E 04011760 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1489100**

54 Título: **Proteínas de fusión heterodiméricas útiles para inmunoterapia dirigida y estimulación general del sistema inmunitario**

30 Prioridad:

08.12.1997 US 986997

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

24.11.2016

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**GILLIES, STEPHEN, DR.;
LO, KIN-MING, DR. y
LAN, YAN, DR.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 590 912 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

Proteínas de fusión heterodiméricas útiles para inmunoterapia dirigida y estimulación general del sistema inmunitario

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión. Más específicamente, la presente invención se refiere a proteínas de fusión heterodiméricas útiles para la terapia inmune dirigida y estimulación general del sistema inmunitario.

Antecedentes de la invención

10 Uno de los reguladores inmunitarios clave es la célula auxiliar T que reacciona a los antígenos presentados en moléculas HLA de clase II. Esta célula CD4⁺ se diferencia en respuesta a la estimulación antigénica y se convierte en un auxiliar de tipo 1 o tipo 2 (Th1 o Th2) de acuerdo con el tipo de citoquinas que segrega. Mosmann y Coffinan, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173 (1989). Una respuesta de Th1 conduce a la secreción de interleuquina 2 (IL-2) y el interferón γ (IFN- γ) que estimula reacciones inmunitarias mediadas por células contra patógenos intracelulares. Una respuesta de Th2 conduce a la secreción de IL-4, IL-5 e IL-10 que estimula respuestas de anticuerpos a patógenos extracelulares. El componente más interesante de este sistema de regulación es que una respuesta inhibe la otra a través de las actividades reguladoras negativas de las citoquinas que se producen. Por lo tanto, IL-4 e IL-10 puede subregular las respuestas de Th1, mientras que IFN- γ puede subregular las respuestas de Th2.

15 La actividad reguladora de las células T auxiliares y su diferenciación después de la exposición al antígeno es regulada también por citoquinas. IL-12, una citoquina heterodimérica unida por puentes disulfuro con una subunidad de 40 kDa y una subunidad de 35 kDa, ejerce una poderosa influencia reguladora positiva sobre el desarrollo de respuestas inmunes de células T auxiliares de Th1. Véase la revisión de Trinchieri, Blood 84: 4008-4027 (1994). IL-12 también tiene un potente efecto sinérgico en la inducción de IFN- γ tanto de células asesinas naturales (NK) como auxiliares T (solicitud de patente europea No. 90123670.3). La IFN- γ secretada inhibe luego cualquier proliferación de células Th2 y polariza la respuesta para favorecer la inmunidad mediada por células.

20 Una forma de cambiar el resultado de una respuesta inmune sería administrar la citoquina adecuada en el momento de la estimulación del antígeno. Si IL-4 fuera la citoquina presente durante la estimulación del antígeno, la respuesta de Th2 sería mayor y se inhibiría la respuesta de Th1. Por el contrario, si IL-12 fuera la citoquina principal presente durante la estimulación del antígeno, la respuesta de Th1 se vería reforzada y la respuesta de Th2 se inhibiría. Sin embargo, la administración sistémica de citoquinas es difícil debido a sus muy cortas vidas medias en circulación y sus efectos secundarios nocivos.

25 Un mejor enfoque consiste en dirigir el efecto de la citoquina a un antígeno de superficie de la célula fusionándola a un anticuerpo (o fragmento derivado del mismo) que tiene especificidad y afinidad por ese antígeno. Véase Gillies, y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428-1432 (1992); la patente estadounidense No 5.650.150, cuya descripción se incorpora aquí por referencia. Alternativamente, la citoquina estimuladora puede enlazarse a un antígeno de proteína mediante un enlace peptídico en forma de una proteína de fusión. Véase Hazama, y colaboradores, Vaccine 11: 629-636 (1993). Sin embargo, la estructura compleja de IL-12 hace que sea más difícil expresarla como una proteína de fusión debido a la necesidad de expresar exactamente la misma relación molar de cada subunidad en el producto final. De hecho, la IL-12 misma se expresa de forma natural y secreta como una mezcla de homodímero p40. D' Andrea, y colaboradores, J. Exp. Med., 176: 1387-1398 (1992). El documento WO 97/20062A1 divulga un polipéptido de la subunidad p40 de IL-2 unido covalentemente a un polipéptido enzimáticamente inactivo.

30 Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica por métodos de producción de proteínas de fusión con citoquinas heterodiméricas y un anticuerpo o un antígeno que mantienen la estructura heterodimérica natural de la citoquina y secreta las moléculas con relaciones equimolares de las subunidades.

Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona proteínas de fusión heterodiméricas útiles para terapia inmune dirigida y estimulación inmunitaria general y métodos para producir estas proteínas de fusión heterodiméricas.

40 En una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión trimérica que comprende una primera y una segunda cadena quimérica unidas por un enlace disulfuro. Cada cadena quimérica comprende una subunidad de la citoquina heterodimérica unida por un enlace péptido a una porción de una cadena pesada de Ig. La subunidad de una de las cadenas quiméricas está unida además por un enlace disulfuro a una subunidad diferente de la citoquina heterodimérica.

En un aspecto de la invención, las proteínas de fusión comprenden una citoquina heterodimérica unida a un anticuerpo, o una porción del mismo. En una realización preferida, la proteína de fusión comprende dos cadenas quiméricas unidas por un enlace disulfuro. Cada cadena quimérica comprende una subunidad diferente de la citoquina heterodimérica unida a través de un enlace peptídico a una porción de una cadena pesada de Ig.

5 Las proteínas de fusión de la invención pueden considerarse quiméricas en virtud de dos aspectos de su estructura. En primer lugar, la proteína de fusión es quimérica porque incluye una cadena de inmunoglobulina (por lo general, pero no exclusivamente, una cadena pesada) de especificidad apropiada de unión al antígeno fusionada a una citoquina heterodimérica dada. En segundo lugar, un inmunocombinado de la invención puede ser quimérico en el
10 sentido de que incluye una región variable y una región constante que puede ser la región constante normalmente asociada con la región variable, o una diferente y por lo tanto una quimera V/C; por ejemplo, regiones variables y constantes de diferentes especies. También abarcadas dentro del término "proteína de fusión" están los constructos que tienen un dominio de unión que comprende regiones marco y regiones variables (es decir, regiones determinantes de complementariedad) de diferentes especies, tales como las divulgadas por Winter, y colaboradores, GB2, 188, 638.

15 La proteína de fusión heterodimérica citoquina-anticuerpo de la presente invención muestra preferiblemente especificidad de unión a antígeno. En una realización preferida, la proteína de fusión heterodimérica citoquina-anticuerpo comprende una cadena pesada. La cadena pesada puede incluir unos dominios CH1, CH2 y/o CH3. En una realización alternativa preferida, la proteína de fusión heterodimérica citoquina-anticuerpo comprende una
20 cadena ligera. La invención proporciona por lo tanto proteínas de fusión en las que la especificidad de unión al antígeno y la actividad de un anticuerpo se combinan con la potente actividad biológica de una citoquina heterodimérica. Una proteína de fusión de la presente invención se puede utilizar para suministrar selectivamente una citoquina heterodimérica a una célula objetivo in vivo para que la citoquina heterodimérica pueda ejercer un efecto biológico localizado.

25 Preferiblemente, la proteína de fusión de la presente invención muestra actividad biológica de citoquina. La citoquina heterodimérica preferida de la proteína de fusión es IL-12. Las fusiones con anticuerpos capaces de enlazar antígenos son útiles para la localización conjunta de la actividad estimuladora inmune de IL-12 ya sea con las células objetivo o con los antígenos de proteína objetivo.

30 Además, la proteína de fusión de la presente invención tiene preferiblemente una vida media en circulación más larga que una citoquina heterodimérica no enlazada. Las fusiones con la porción Fc de anticuerpos e IL-12 son útiles para alterar la farmacología y la biodistribución de la molécula al incrementar su vida media en circulación y su afinidad por las células portadoras de receptores de Fc, por ejemplo, células presentadoras de antígenos. Los cambios en la biodistribución pueden alterar también su toxicidad sistémica al cambiar el mecanismo por el cual se elimina de la circulación.

35 En otro aspecto de la invención, las proteínas de fusión comprenden una citoquina heterodimérica enlazada a un antígeno. La proteína de fusión heterodimérica preferida antígeno-citoquina de la presente invención muestra actividad biológica de citoquina y actividad antigénica. Además, la proteína de fusión de la presente invención tiene preferiblemente una vida media en circulación más larga que una citoquina heterodimérica no enlazada. La citoquina heterodimérica preferida de la proteína de fusión es IL-12.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión es una proteína de fusión trimérica que comprende una primera y una segunda cadena quimérica enlazada por un enlace disulfuro. Cada cadena quimérica comprende una subunidad de la citoquina heterodimérica, enlazada por un enlace peptídico a un antígeno. La subunidad de una cadena quimérica está enlazada además por un enlace disulfuro a una subunidad diferente de la citoquina heterodimérica.

La invención también cuenta con constructos de ADN que codifican las proteínas de fusión antes descritas, y líneas celulares, por ejemplo, mielomas, transfectados con estos constructos.

45 La invención también incluye un método para dirigir selectivamente una citoquina heterodimérica. En una realización preferida, el método comprende el enlazamiento de al menos una subunidad de una citoquina heterodimérica mediante un enlace peptídico con una porción de una cadena pesada de Ig. En una realización alternativa preferida, el método comprende el enlace de cada una de las dos subunidades de una citoquina heterodimérica mediante un
50 enlace peptídico con una porción de una cadena pesada de Ig, formando de este modo dos cadenas quiméricas. Las dos cadenas quiméricas están enlazadas por un enlace disulfuro, formando de este modo una proteína de fusión heterodimérica. En aún otra realización preferida, el método comprende (1) el enlazamiento de una de las dos subunidades de una primera citoquina heterodimérica mediante un enlace peptídico a una cadena pesada de Ig, formando de este modo una primera cadena quimérica; (2) el enlazamiento de una de las dos subunidades de una segunda citoquina heterodimérica mediante un enlace peptídico a una cadena pesada de Ig, formando de este modo
55 una segunda cadena quimérica; y (3) el enlazamiento de la primera y segunda cadenas quiméricas mediante un enlace disulfuro, formando de este modo una proteína de fusión. Las proteínas de fusión resultantes pueden exhibir

una especificidad de enlazamiento para un antígeno predeterminado y actividad biológica de citoquina.

La invención también incluye un método para suministrar selectivamente una citoquina heterodimérica a una célula objetivo. El método incluye proporcionar una proteína de fusión heterodimérica de citoquina que incluye una cadena de Ig quimérica que incluye una cadena pesada de Ig que tiene una región variable específica para un epítipo en la célula objetivo y una región constante unida en su terminal carboxilo mediante un enlace peptídico a una citoquina, y una cadena ligera de Ig en combinación con la cadena pesada quimérica de Ig, formando un sitio funcional de unión al antígeno, y la administración de la proteína de fusión en una cantidad suficiente para alcanzar la célula objetivo para un sujeto que alberga la célula objetivo.

Además, la invención presenta un método para aumentar la vida media en circulación de una citoquina heterodimérica. En una realización preferida, el método comprende el enlazamiento de cada una de las dos subunidades de una citoquina heterodimérica mediante un enlace peptídico con un polipéptido, formando de ese modo dos cadenas quiméricas. Las dos cadenas quiméricas están enlazadas por un enlace disulfuro, formando con ello una proteína de fusión heterodimérica. En aún otra realización preferida, el método comprende (1) el enlazamiento de una de las dos subunidades de una primera citoquina heterodimérica mediante un enlace peptídico con un polipéptido, formando con ello una primera cadena quimérica; (2) el enlazamiento de una de las dos subunidades de una segunda citoquina heterodimérica mediante un enlace peptídico con un polipéptido, formando con ello una segunda cadena quimérica; y (3) el enlazamiento de la primera y segunda cadena quimérica mediante un enlace disulfuro, formando con ello una proteína de fusión. El polipéptido puede ser albúmina de suero, un antígeno, y una porción de una cadena pesada de Ig. Las proteínas de fusión resultantes muestran actividad biológica de citoquina.

Las proteínas de fusión IL-12 de la presente invención son útiles para direccionamiento específico o estimulación inmune cuando es importante generar una respuesta inmune mediada por células, tal como en la inmunoterapia de cáncer o respuestas antivirales. También son útiles para la subregulación específicamente de las respuestas de Th2 que a menudo conducen a la sobreproducción de IL-4. Esta citoquina ha demostrado ser esencial para el desarrollo de alergia a través de la inducción de una respuesta de Th2 y la sobreproducción resultante de anticuerpo IgE.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos de la presente invención, y las diversas características de los mismos, pueden entenderse mejor a partir de la siguiente descripción, cuando se lee junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la FIG. 1 es una representación esquemática de la estructura de la proteína predicha de las proteínas de fusión heterodiméricas;

La FIG. 2 es una representación esquemática de un SDS-PAGE que muestra un análisis, bajo condiciones reductoras, de proteínas secretadas por células transfectadas con vectores que expresan la proteína de fusión Fc-p35 (carril 1), la proteína de fusión Fc-p40 (carril 2), la proteína Fc-p35 de fusión y la proteína de fusión Fc-p40 (carril 3), la proteína de fusión Fc-p35 y la subunidad p40 (carril 4), y la subunidad p35 y la proteína de fusión Fc-p40 (carril 5);

la FIG. 3 es una representación esquemática de la estructura de la proteína predicha de las proteínas de fusión expresadas;

la FIG. 4 es un gráfico de barras que representa la capacidad de diversas proteínas de fusión para estimular la producción de IFN- γ ;

la FIG. 5A es una representación esquemática de un SDS-PAGE que muestra un análisis de proteínas de fusión enteras de anticuerpo-IL-12 producidas por dos transfectantes independientes, bajo condiciones no reductoras (carriles 1 y 2) y condiciones reductoras (carriles 3 y 4);

las FIGS. 5B-D son gráficos de líneas que representan los efectos de la IL-12 humana (X), la proteína de fusión Hu-KS-IL-12 con ambas cadenas IL-12 humanas (cuadrados rellenos), y proteína de fusión Hu-KS-1/4-p40 humana p35 de ratón (cuadrados sin relleno) sobre la proliferación de PBMC humanas activadas por mitógeno (Panel B); inducción de la secreción de IFN- γ a partir de PBMC activadas con PHA (Panel C) y a partir de células efectoras de ratón, estimuladas previamente con Concanavalina A (Panel D);

las FIGS. 6A-B son gráficos de líneas que representan los efectos de la IL-12 (X), proteína de fusión de una sola cadena con subunidades p35 y p40 humanas (cuadrados rellenos), y proteína de fusión de una sola cadena con una subunidad p35 de ratón y una subunidad p40 humana (cuadrados sin relleno) en la inducción de la secreción de IFN- γ ;

la FIG. 6C son gráficos de líneas que representan la actividad de unión al antígeno de proteína de fusión entera Hu-KS-1/4-IL-12 (cuadrados sin relleno), proteína de fusión de una sola cadena con IL-12 humana (diamante sin relleno), proteína de fusión de una sola cadena con p40 humana p35 de ratón (círculos sin relleno y libres), e IL-12 humana (triángulos sin relleno);

5 la FIG. 7 es un gráfico que representa la vida media en suero de Hu-KS-IL-12 (p40 humana p35 de ratón), como se mide por un ELISA usando una etapa de captura con cadena H y L antihumana y una segunda detección ya sea con anticuerpo Fc antihumano (diamantes con relleno) o anticuerpo IL-12 p40 antihumano (cuadrados sin relleno);

10 la FIG. 8 (paneles superior e inferior) son gráficos de líneas que representan la inmunogenicidad de las proteínas de fusión IL-12. Las diluciones en suero de animales inyectados ya sea con anticuerpo Hu-KS-1/4 o Hu-KS-1/4-IL-12 (p40 humana p353 de ratón) se ensayaron para determinar la reactividad con anticuerpo Hu-KS-1/4.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención describe proteínas de fusión entre citoquinas heterodiméricas y otras proteínas. Las citoquinas heterodiméricas pueden fusionarse, por ejemplo, con proteínas con propiedades antigénicas o de direccionamiento. Las proteínas de fusión entre citoquinas heterodiméricas y proteínas con propiedades antigénicas o de direccionamiento pueden tener una vida media en circulación más larga que las citoquinas heterodiméricas no enlazadas. Las propiedades antigénicas o de direccionamiento no son necesarias para el aumento de la vida media en circulación ya que esta propiedad también se puede lograr mediante la fusión de una citoquina heterodimérica con una proteína que carece de propiedades antigénicas o de direccionamiento tales como, por ejemplo, albúmina de suero.

20 Las proteínas de fusión de esta invención pueden ser producidas por técnicas de ingeniería genética. Como se muestra en la FIG. 1, se pueden producir diversos constructos de proteínas de fusión por los métodos de la presente invención. En una realización, una subunidad de la citoquina heterodimérica fusionada a un polipéptido es coexpresada con una subunidad libre del otro tipo. Una vez expresada, la cadena quimérica se enlaza mediante un enlace disulfuro a la subunidad libre (Fig. 1B). En otra realización, el polipéptido fusionado con la subunidad se puede enlazar a otro de dichos polipéptidos. Dado que cada polipéptido se enlaza a una citoquina heterodimérica, el constructo resultante tiene dos moléculas de la citoquina heterodimérica (Fig. 1C). En aún otra realización, cada subunidad de la citoquina heterodimérica está fusionada a un polipéptido y las dos cadenas quiméricas están enlazadas por un enlace disulfuro. El constructo resultante tiene sólo una molécula de la citoquina heterodimérica (Fig. 1D). En aún otra realización, dos subunidades de la citoquina heterodimérica fusionada a un polipéptido son coexpresadas con una subunidad libre. El constructo resultante tiene tres subunidades de la citoquina heterodimérica (Fig. 1E).

En la actualidad, la única citoquina heterodimérica conocida es IL-12. Sin embargo, a medida que se identifican y se secuencian nuevas citoquinas heterodiméricas, un experto en la materia será capaz de utilizar los métodos de la presente invención para producir proteínas de fusión con estas nuevas citoquinas heterodiméricas.

35 Los métodos para sintetizar formas de realización útiles de la invención se describen, así como ensayos útiles para probar sus actividades farmacológicas, tanto *in vitro* como en modelos animales preclínicos *in vivo*. El constructo génico preferido que codifica una cadena quimérica (es decir, una subunidad de la citoquina heterodimérica fusionada a un polipéptido) incluye, en orientación 5' a 3', un segmento de ADN que codifica un polipéptido y ADN que codifica para una subunidad de la citoquina heterodimérica. Un constructo génico preferido alternativo incluye, en orientación 5' a 3', un segmento de ADN que codifica una subunidad de la citoquina heterodimérica y ADN que codifica para un polipéptido. El gen fusionado es ensamblado o insertado en un vector de expresión para la transfección de las células receptoras apropiadas donde se expresa.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1: Clonación de los ADNc que codifican subunidades de IL-12 humana y de ratón

45 Los monocitos de sangre periférica humana (PBMC) se obtuvieron de un voluntario sano y se purificaron por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) (1700 rpm durante 20 min). La capa "leucocitaria" que contiene los PBMC se diluyó con medio de cultivo libre de suero (SF-RPMI) hasta un volumen de 50 mL y se recogió por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Se resuspendieron las células en medio de cultivo celular AIM-V (GIBCO) a una densidad de 5×10^6 células/mL y se cultivaron durante 2 días a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada. Las células unidas se seleccionaron mediante agitación suave del matraz de cultivo para remover las células no adherentes. Se añadió medio fresco que contiene éster de forbol (100 nM) y el ionóforo de calcio, ionomicina (0,1 µg/mL). Después de tres días, se recolectaron las células por raspado suave y centrifugación. Se preparó Poli A + ARNm usando perlas recubiertas con oligo dT (Dynal, Inc.).

Se clonaron ADNc de subunidades utilizando reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Se sintetizó ADNc de la primera cadena en una reacción de 50 µl que contiene cebador de oligo dT (50 µg/mL), regulador de reacción, ARNsin (10 U/mL) y transcriptasa inversa. La incubación fue a 43°C durante 2 horas, seguido por extracción con fenol, fenol:cloroformo (50:50) y precipitación con etanol. El producto de ADNc se utilizó como molde para reacciones PCR que contienen Taq polimerasa y regulador de reacción (regulador 10x; Perkin Elmer), cebadores sentido y antisentido (0,2 a 0,5 µM cada uno), y 10% de la reacción de ADNc. Las secuencias de cebador fueron 5'-CCAGAAAGCAAGAGACCAGAG-3' (SEQ ID NO: 1) para el cebador sentido y 5'-GGAGGGACCTCGAGTTTTAGGAAGCATTTCAG-3' (SEQ ID NO: 2) para el cebador antisentido del ADNc de la subunidad p35. El cebador sentido se deriva de una secuencia en la región 5' no traducida del mensaje de p35 justo secuencia arriba de un sitio XmaI, mientras que el cebador antisentido codifica un codón de detención de la traducción seguido poco después por un sitio XhoI conveniente para la subclonación direccional en un vector de expresión. Los cebadores para el ADNc de la subunidad p40 fueron 5'-CTCCGTCCTGTCTAGAGCAAGATGTGTC-3' (SEQ ID NO: 3) para el cebador sentido y 5'-GCTTCTCGAGAACCTAACTGCAGGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 4) para el cebador antisentido. El cebador sentido codifica un sitio XbaI único secuencia arriba del sitio de inicio de la traducción, mientras que el cebador antisentido codifica un codón de detención y un sitio XhoI único como anteriormente. Ambas secuencias de subunidades, clonadas con estos cebadores de PCR, se expresarán como proteínas individuales y por lo tanto requieren secuencias líder secretoras nativas (u otras) para el montaje y secreción del heterodímero adecuado. Las reacciones PCR consistieron en 40 ciclos incluyendo: 1 min a 92°C, 2 min a 52°C, y 3 min a 72°C, seguido de una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min. Los productos se purificaron en gel y se clonaron en el vector de clonación SK (Stratagene) para la verificación de la secuencia. La secuenciación del ADN utilizando un kit comercial (U.S. Biochemical) se llevó a cabo en cada uno de los ADNc de la subunidad. El mismo procedimiento se puede utilizar para clonar el ADNc de la subunidad p35 de ratón a partir de células de bazo activadas con Concanavalina A (5 µg/mL en medio de cultivo durante 3 días). Los cebadores recomendados son 5'-CCTCTACTAACATGTGTCAATCACGCTACCTC-3' (SEQ ID NO: 5) para el cebador sentido y 5'-CCCTCGAGTCAGCGGAGCTCAGATAGCC-3' (SEQ ID NO: 6) para el cebador antisentido que codifica los mismos sitios de restricción como se describió anteriormente para la subunidad p35 humana.

Ejemplo 2: Expresión de combinaciones de proteínas de fusión en células de mamífero transfectadas

Con el fin de elaborar las versiones fusionadas de cada subunidad, los ADN que codifican la secuencia de la proteína madura de cada una se adaptaron de la siguiente forma. El ADN de la subunidad p40 se digirió con NdeI que corta muy cerca de la unión de la proteína madura y la secuencia líder, y XhoI. Se sintetizó un oligonucleótido adaptador con la secuencia 5'-CCGGGCAAGTCCA-3' (SEQ ID NO: 7) hibridada con un segundo oligonucleótido, parcialmente complementario con la secuencia 5'-TATGGACTTGC-3' (SEQ ID NO: 8). El ADN bicatenario contiene una secuencia que sobresale compatible con la ligación a un sitio XmaI en el extremo 5' y un sitio NdeI en el extremo 3'. Este fragmento se ligó al fragmento NdeI-XhoI del ADNc de p40 y se clonó como un fragmento XmaI a XhoI en el vector pdC-Fc-X, cortado con XmaI y XhoI. Este vector ya contiene un fragmento de ADN que codifica Fc de IgG1 humano en su configuración genómica (que contiene intrones y exones) y fusionado secuencia abajo de una secuencia líder derivada de una cadena ligera de ratón. Véase, Gillies, y colaboradores, J. Immunol. Methods 125: 191-202 (1989). La adición de un fragmento de ADN a su sitio XmaI único permite la producción de proteínas de fusión unidas directamente al terminal carboxilo de la Fc, siempre que se mantenga el marco de lectura entre las dos secuencias (Lo, y colaboradores, patente estadounidense No. 5.541.087). Otras proteínas (por ejemplo, antígeno, albúmina de suero) se pueden fusionar a los terminales amino de estas subunidades de la misma manera. Las ventajas de este método incluyen las grandes cantidades de producto producido y la facilidad de purificación del producto mediante unión a y elución de proteína A Sefarosa.

Se usó la misma estrategia general para fusionar el ADN de la subunidad p35 a Fc humana. En este caso, se sintetizó un enlazador XmaI-Ball usando los oligonucleótidos 5'-CCGGGAAGAAACCTCCCCGTGG-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-CCACGGGGAGGTTTCTTC-3' (SEQ ID NO: 10), que se ligaron a un ADN de la subunidad p35, se cortaron con Ball y XhoI, y se subclonaron como un fragmento XmaI-XhoI en el vector pdC-Fc-X, como se describió anteriormente. La subunidad p35 humana ha demostrado ser activa para las células humanas, pero no para las células de ratón, en términos de la actividad de IL-12, mientras que la subunidad p40 humana no muestra especificidad de especie. Por lo tanto, la subunidad p40 humana se puede utilizar para elaborar ya sea todas las proteínas de fusión IL-12 humanas o proteínas híbridas de fusión humana/ratón.

Los constructos resultantes codifican proteínas de fusión Fc-p35 o Fc-p40 que se espera que dimericen espontáneamente en proteínas de 120 kD (50 kD de la Fc) y 130 kD, respectivamente, y que migren después de la reducción sobre geles desnaturalizantes de SDS como proteínas de 60 kD y 65 kD. Los ADNc de las subunidades individuales se subclonaron en el vector de expresión pdC (sin la Fc) para su expresión como proteínas independientes. Este vector proporciona secuencias promotoras para la expresión de ARNm, transcritas a partir de la inserción de ADNc, después de la transfección de células de mamífero. También proporciona una región 3' no traducida y un sitio de adición de poli A, secuencia abajo del sitio de inserción 3' XhoI. También hay secuencias necesarias para la propagación del plásmido en *E. coli* y selección con ampicilina, así como un gen marcador seleccionable, tal como la dihidrofolato reductasa (dhfr), para conferir resistencia al metotrexato. Estos mismos componentes se utilizan también en el vector pdC-Fc-X para la expresión de las proteínas de fusión.

Para la expresión de heterodímeros de proteína de fusión IL-12 biológicamente activos, se expresaron transitoriamente diferentes combinaciones de los vectores individuales que codifican formas de fusión y que no son de fusión de las subunidades mediante transfección conjunta de células de carcinoma epidérmico 293 humano. El ADN se purificó utilizando kits preparativos (Wizart, Promega Inc.), precipitado con etanol para esterilización y resuspensión en agua estéril. Se prepararon precipitados de fosfato de calcio por métodos estándar utilizando 10 µg de ADN por mL (5 µg de cada uno cuando dos plásmidos fueron cotransfectados) y se añadieron 0,5 mL/placa a cultivos de 293 que crecen en placas de 60 mm hasta aproximadamente 70% de confluencia. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. (Sambrook, Fritsch y Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Después de 16 h, se removió el medio que contenía el precipitado y se reemplazó con medio fresco. Después de 3 días, se removió el sobrenadante y se analizó con respecto a la producción de la expresión génica transfectada por ELISA, determinación biológica de la actividad de IL-12, o inmunoprecipitación y análisis sobre geles de SDS de proteínas marcadas radiactivamente. Para la marcación, se utilizó medio sin metionina para reemplazar el medio de cultivo en el segundo día del cultivo y se añadió metionina con ³⁵S (100 µCi/mL). Después de una incubación adicional de 16 horas, se recogió el medio, se clarificó por centrifugación (5 min a 13.000 rpm en una microcentrífuga de mesa) y se incubó con perlas de proteína A-Sefarosa (10 µl de volumen de perlas por mL de sobrenadante del cultivo). Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las perlas mediante centrifugación repetida y resuspensión en regulador de PBS que contenía 1% de NP-40. Se resuspendió el precipitado final en regulador de gel que contenía SDS y se calentó a ebullición durante 2 min. Después de remover las perlas por centrifugación, se dividió el sobrenadante en dos alícuotas. Se añadió agente reductor (5% de 2-mercaptoetanol) a una muestra y se calentaron a ebullición ambas durante 5 min antes de cargar en un gel de poliacrilamida de SDS. Después de la electroforesis, se expuso el gel a una película de rayos X (autorradiografía).

Un ejemplo de un análisis de la coexpresión de diversas proteínas de fusión y proteínas expresadas de forma individual, bajo condiciones reductoras, se muestra en la FIG. 2. Los resultados muestran que la subunidad p35 no puede ser secretada de la célula, incluso cuando se expresa como una proteína de fusión con el fragmento Fc (carril 1). La subunidad p40, por otro lado, fue fácilmente secretada cuando se fusionó a Fc (carril 2). La subunidad p35 fue secretada cuando pudo aparearse con la subunidad p40, ya sea como un emparejamiento de fusión Fc-p35 con una proteína de fusión Fc-p40 (carril 3), el emparejamiento Fc-p35 con p40 libre (carril 4), o emparejamiento de p35 libre con la proteína de fusión Fc-p40 (carril 5). En todos los casos de expresión de una subunidad libre, junto con una proteína de fusión, la subunidad libre se ensambla con la otra subunidad y forma un enlace covalente, un enlace disulfuro. Un diagrama de estas diversas combinaciones se muestra en la FIG. 1. Obsérvese que el constructo con cada subunidad fusionada a Fc y coexpresada en la misma célula tiene una molécula de IL-12 por Fc (Fig. 1D), mientras que los constructos con una única fusión de subunidad a Fc pareada con una subunidad libre (del otro tipo) tiene dos moléculas de IL-12 por Fc (FIG. 1C). Se espera que la expresión en células transfectadas de forma estable sea diferente de la expresión transitoria puesto que la expresión y secreción es independiente de p35. Por lo tanto, la sobreexpresión de p40 es posible y más ventajosa para la célula puesto que puede ser fácilmente exportada. Esto podría conducir a una sobreabundancia de subunidades Fc-p40 en relación con Fc-p35 y resultar en una mezcla de heterodímero y la secreción del homodímero p40 de la célula. Esto sería ineficaz y daría lugar a problemas de purificación. Es probable que la expresión de p35 tenga una desventaja de crecimiento, ya que el exceso de proteína probablemente se degrada en el retículo endoplasmático, a menos que se empareje en forma efectiva con la subunidad p40. Por lo tanto, es posible tomar ventaja de esta situación para asegurar la secreción equilibrada solamente del producto de fusión heterodímero, mediante la expresión de la subunidad p35 como una proteína de fusión junto con la subunidad p40 libre. Sólo la proteína de fusión p35 emparejada con una cantidad equimolar de la subunidad p40 puede ser secretada. La purificación de este producto en proteína A resulta en una preparación homogénea de heterodímero. Una representación esquemática de la estructura de la proteína predicha de las proteínas de fusión expresadas se proporciona en la FIG. 3.

Ejemplo 3: Actividad de las proteínas de fusión en un ensayo de inducción de IFN-γ

Se midió la actividad biológica en un ensayo de inducción de IFN-γ utilizando PBMC humanas activadas por mitógeno, purificadas como se describe en el Ejemplo 1. Después de la centrifugación en gradiente, se resuspendieron las células en medio de cultivo celular que contenía 10% de suero bovino fetal (RPMI-10) y fitohemaglutinina (PHA; 10 µg/mL) a una densidad de 5×10^5 células/mL y se cultivaron durante 3 días a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada. Las células activadas con PHA fueron recogidas por centrifugación, se lavaron tres veces con un volumen igual de SF-RPMI y se resuspendieron en RPMI-10 fresco (1×10^6 células/mL). Se dispensaron las alícuotas (100 µl) en los pozos de múltiples placas de 96 pozos para obtener un número final de células de 10^5 por pozo. Las muestras de ensayo del medio de cultivo se diluyeron en serie en medio de cultivo fresco y se añadieron a los pozos de la placa de 96 pozos. Se añadió medio de estimulación (50 µl/pozo) que contenía 10% de suero e IL-2 (25 U/mL). Los pozos de control recibieron sólo IL-2 (control negativo) o tanto IL-2 como IL-12 comercial (R & D Systems) pero no muestra (control positivo). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ después de lo cual se retiraron alícuotas de tiempo (20 µl) para el análisis de la concentración de IFN-γ por ELISA.

Se usó el mismo ensayo para determinar la actividad de formas de ratón de las proteínas de fusión IL-12, excepto porque se utilizaron células de bazo de ratones Balb/c activadas durante 3 días con Concanavalina A, en lugar de

PBMC humanas activadas con PHA. Se usó un ELISA específico para ratón para cuantificar la cantidad de IFN- γ inducida por las moléculas híbridas p40 humanas/p35 de ratón a partir de células de ratón.

5 Para el sistema humano, se desarrolló un ELISA cuantitativo mediante el revestimiento de placas de 96 pozos (placa Nunc-Immuno F96 Cert. Maxisorb) con un anticuerpo monoclonal de ratón contra IFN- γ humano (1 μ g/mL) en
 10 solución salina regulada con fosfato (PBS; Pestka Biological Laboratories) durante la noche a 4°C, lavando el anticuerpo no enlazado tres veces con PBS, y bloqueando con una solución de 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y 1% de suero de cabra en PBS (150 μ l/pozo durante 2 horas a 37°C). Después de lavar las placas
 15 bloqueadas cuatro veces con PBS, se añadieron muestras de ensayo y diluciones del patrón de IFN- γ en un volumen final de 100 μ l/pozo. Después de incubación durante la noche a 4°C, se lavaron las placas cuatro veces
 20 con PBS, y se añadió un anticuerpo policlonal de conejo contra IFN- γ humano (dilución 1/10000; Pestka Biological Laboratories). Después de una incubación adicional durante 1 hora a 37°C y cuatro lavados con PBS, se añadió un anticuerpo policlonal que detecta anticonejo de asno, conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución 1/700; Pestka Biological Laboratories) durante 1 hora a 37°C. Se lavaron luego las placas cuatro veces con PBS y se añadieron 100 μ l de sustrato azul K (ELISA Technologies, Neogen Corp.) hasta que el color en los pozos que contenían la curva estándar se desarrolló lo suficientemente, momento en el se añadieron 100 μ l de solución de detención Roja (ELISA Technologies). Se leyó la placa a 650 nm usando un lector de placas de ELISA (Dynatech MR7000) y se calculó la cantidad de IFN- γ comparando la densidad óptica de la muestra de ensayo con una curva estándar derivada de las diluciones del IFN- γ de control. Se indujo la cantidad de IFN- γ en presencia tanto de IL-2 como de IL-12 generalmente en intervalos de 1.200 - 2.000 pg/mL, mientras que la cantidad producida en ausencia de IL-12 fue generalmente menor de 50 pg/mL.

La actividad biológica de los sobrenadantes de cultivo descritos en el Ejemplo 2 se compararon por su capacidad para estimular la producción de IFN- γ . Como se muestra en la FIG. 4, se obtuvo la actividad más alta con la proteína de fusión Fc-p35 coexpresada con la subunidad p40 libre, aunque también fueron activas las otras combinaciones con ambas subunidades. A continuación se describen mediciones más precisas con proteínas purificadas.

25 **Ejemplo 4: Expresión de proteínas de fusión anticuerpo-IL-12**

Los experimentos descritos en el Ejemplo 2 demuestran que una forma conveniente de expresar proteínas de fusión con la citoquina heterodimérica de IL-12 es coexpresar una proteína de la subunidad p35 fusionada junto con la subunidad p40 libre en la misma célula. Esto se puede hacer mediante dos enfoques: el primero se logra mediante la cotransfección del vector de proteína de fusión y el vector de expresión p40 de forma simultánea (es decir, transfección simultánea); la segunda es transfectar primero una célula con p40 solamente y seleccionar secretores estables de alto nivel de esta proteína, y luego utilizar esta célula como un receptor mediante el constructo que expresa la proteína de fusión (es decir, transfección, secuencial). El último método es particularmente útil cuando la proteína de fusión es una molécula de anticuerpo tanto con una cadena pesada como ligera que necesita ser ensamblada adecuadamente para el montaje y la secreción correctos. Teóricamente, la fusión de la subunidad p35 podría ser a la cadena pesada o ligera, pero la modalidad preferida sería al terminal carboxilo de la cadena pesada, donde puede ser más libre para interaccionar con el receptor de IL-12 sobre las células. También es posible fusionar la subunidad p35 a través de su terminal carboxilo al terminal amino de la cadena pesada o ligera. En este caso, se requeriría una secuencia líder para la expresión de p35, ya que estaría en el terminal amino de la proteína de fusión, por lo que requiere su direccionamiento al retículo endoplasmático para el ensamblaje y secreción de la célula.

40 El constructo de ácido nucleico también puede incluir al promotor endógeno y reforzador para el gen que codifica la región variable para regular la expresión de la cadena de inmunoglobulina quimérica. Por ejemplo, los genes que codifican la región variable se pueden obtener como fragmentos de ADN que comprenden al péptido líder, el gen VJ [regiones variables (V) reordenadas funcionalmente con el segmento de unión (J)] para la cadena ligera o el gen VDJ para la cadena pesada, y el promotor endógeno y reforzador para estos genes. Alternativamente, el gen que
 45 codifica para la región variable se puede obtener separadamente de los elementos reguladores endógenos y utilizarse en un vector de expresión que proporciona estos elementos.

Los genes de la región variable se pueden obtener por procedimientos de clonación de ADN convencionales a partir de células, que producen el anticuerpo deseado. El cribado de la biblioteca genómica para una región variable específica reordenada funcionalmente se puede lograr mediante el uso de sondas de ADN apropiadas tales como
 50 segmentos de ADN que contienen la secuencia de ADN de la región J y secuencias en dirección 3'. La identificación y confirmación de los clones correctos se consigue entonces mediante secuenciación de ADN de los genes clonados y la comparación de la secuencia con la secuencia correspondiente del ARNm de longitud completa, adecuadamente empalmado.

4.1 Transfección simultánea

55 La transfección simultánea se puede lograr construyendo un vector con dos unidades de transcripción y un gen marcador seleccionable. Tales vectores se describen para la expresión de anticuerpos recombinantes en células de

mamífero. Gillies, y colaboradores, J. Immunol. Methods 125: 191-202 (1989). Un método alternativo es utilizar dos vectores de plásmidos independientes (uno con una unidad de transcripción para la proteína de fusión y el otro con una unidad de transcripción para la subunidad p40) con sus propios genes marcadores seleccionables, y seleccionar las células que expresan, exitosamente transfectadas, mediante el cultivo en presencia de los fármacos a los que las células se han vuelto resistentes (por ejemplo, metotrexato en células transfectadas con el gen dhfr). Otro enfoque sería el uso de un vector de expresión para la proteína de fusión de la subunidad p35 que contiene un gen marcador seleccionable y la cotransfección de un segundo vector sin un gen marcador seleccionable y una unidad de transcripción para la subunidad p40. Cualquier clon resistente a fármacos obtenido por el último método podría no secretar la proteína de fusión en ausencia de la subunidad p40 y de este modo, no sería detectada por un ensayo de ELISA del sobrenadante de cultivo. Sólo las células transfectadas con ambos vectores secretarían al heterodímero intacto proteína de fusión-p40.

Se construyó un vector plásmido (pdHL7-14.18-p35), como se describe en Gillies, y colaboradores, J. Immunol. Methods 125: 191-202 (1989), que contiene un gen marcador seleccionable dhfr, una unidad de transcripción que codifica una cadena ligera de anticuerpo anti-GD2 14.18 humanizado, y una unidad de transcripción que codifica una cadena pesada humanizada fusionada a la subunidad p35 de IL-12 humana. La fusión se consiguió por ligación del fragmento XmaI a XhoI del ADNc de la subunidad p35 adaptada, tal como se describe en el Ejemplo 2, a un único sitio XmaI en el extremo del exón CH3 del gen de la cadena H de IgG1 humana. Tanto las unidades de transcripción de cadena H como L incluyen un promotor de citomegalovirus (CMV) (en lugar del promotor de metalotioneína en la referencia original) en el extremo 5' y un sitio de poliadenilación en el extremo 3'. Se construyó un vector similar (pC-p40) para la expresión de la subunidad p40 libre pero no incluía un gen marcador seleccionable (dhfr u otro) pero todavía se utiliza el promotor CMV para la transcripción.

La región de codificación en este caso incluía la secuencia líder natural de la subunidad p40 para el tráfico adecuado al retículo endoplasmático y ensamblaje con la proteína de fusión. Se construyó otra versión de este vector (pNC-p40), que incluye el gen de resistencia a neomicina, se construyó para uso en la transfección secuencial.

Para la transfección simultánea, los ADN de plásmido (aproximadamente 10 µg de cada plásmido; pdHL7-14.18-p35 y pC-p40) fueron linealizados por digestión con enzima de restricción Sall, se purificaron mediante el kit de limpieza de PCR (Wizard, Promega), y electroporación en 5×10^6 células de mieloma (en 0,5 mL de PBS enfriado en hielo) utilizando un ajuste de 0,25 voltios y 500 µF. Después de una recuperación durante 10 minutos en hielo, se transfirieron las células a un medio fresco y se sembraron en placas de 96 pozos aproximadamente a razón de 10^5 células/mL. Después de 48 horas, se alimentaron las células con medio que contiene metotrexato (0,1 µM). Se añadió medio fresco mediante el intercambio de la mitad del volumen de fluido cada 4 días hasta que aparecieron los clones. La expresión de la proteína de fusión deseada anticuerpo-IL-12 se analizó usando un ensayo de ELISA con base en la detección de Fc del anticuerpo. El anticuerpo de captura reaccionó con cadenas H y L humanas y la detección utilizó un anticuerpo específico para Fc humana. Los clones positivos se expandieron en medio de selección y se purificó el producto mediante la unión a y elución de proteína A Sefarosa como se describió anteriormente. Las proteínas eluidas se analizaron por PAGE y se detectaron por tinción con azul de Coomassie.

4.2 Transfección secuencial

Para la transfección secuencial, se sometió a electroporación el plásmido pNC-p40 en las células, como se describió anteriormente, y se sembraron las células en placa y seleccionaron en medio que contenía G418. Los sobrenadantes de cultivo de los clones resistentes a los fármacos se ensayaron por ELISA para la producción de la subunidad p40. El anticuerpo de captura fue un p40 de IL-12 anti-humano de ratón y se dirigió el anticuerpo de detección a p40/p70 de IL-12 humano. Los kits ELISA comerciales están disponibles a través de varios fabricantes para este propósito (Pharminogen, San Diego; R & D Systems, MN). Los mayores productores de clones de células se ensayaron para la expresión estable de p40.

Uno de tales clones se transfectó con el ADN del plásmido pdHL7-14.18-p35, como se describió anteriormente, y los clones fueron seleccionados en medio que contenía metotrexato. La expresión de la proteína de fusión deseada anticuerpo-IL-12 se ensayó usando un ensayo de ELISA basado en la detección de Fc del anticuerpo. El anticuerpo de captura reaccionó con cadenas H y L humanas y la detección utilizó un anticuerpo específico para Fc humana. Los clones positivos se expandieron en medio de selección y se purificó el producto mediante la unión a, y elución de proteína A-Sefarosa como se describió anteriormente. Las proteínas eluidas se analizaron por PAGE y se detectaron por tinción con azul de Coomassie.

4.3 Actividades de las proteínas de fusión anticuerpo-IL-12

Como se resume en la Tabla 1, se obtuvieron los clones de células que expresan proteína de fusión ya sea por transfección simultánea o transfección secuencial, pero los clones más altamente productivos se obtuvieron usando transfección secuencial. Los productos secretados por dos transfectantes individuales se analizaron por la composición de la cadena. El análisis por SDS-PAGE se muestra en la FIG. 5A. Claramente, ambos clones

secretaron la misma cantidad relativa de cada una de las tres cadenas: cadena ligera, cadena H-p35, y p40 unida covalentemente, lo que indica el ensamblaje completo y adecuado de esta molécula de cadena 6. Se repitió el mismo proceso con un segundo anticuerpo, KS-1/4, reactivo con el antígeno EpCAM expresado en prácticamente todas las células de carcinoma epidérmico (carcinoma de colon, pulmón, mama, próstata, páncreas, ovario y de vejiga). Se obtuvieron exactamente los mismos resultados, incluyendo actividades de unión normales de los anticuerpos a sus respectivos antígenos.

Las actividades biológicas de las proteínas de fusión enteras de anticuerpo-IL-12 se muestran en la FIG. 5. Cuando se analizó la capacidad de estimular la proliferación de las PBMC humanas activadas por mitógeno, la proteína de fusión Hu-KS-IL-12 con ambas cadenas IL-12 humanas era casi tan activa en una base molar como el estándar IL-12 humana (FIG. 5B). El mismo constructo que contenía la subunidad p35 de ratón fusionada a Hu-KS-1/4 fue significativamente menos activo en la estimulación de PBMC humanas. Cuando se ensayó la capacidad de inducir la secreción de IFN- γ a partir de PBMC activadas con PHA, la proteína Hu-KS-IL-12 con cadenas IL-12 humanas fue aproximadamente 6 veces menos activa que el estándar de IL-12, mientras que la forma híbrida fue adicionalmente 4 veces menos activa (FIG. 5C). Cuando se utilizaron células efectoras de ratón (previamente estimuladas con Concanavalina A), la forma híbrida fue aproximadamente 50 veces menos activa que el estándar de IL-12 de ratón. La forma completamente humana fue inactiva (FIG. 5D), como se espera a partir de la literatura. Véase, Schoenhaut, y colaboradores, J Immunol. 148: 3433-3340 (1992).

Tabla 1: Comparación de la cotransfección y transfección secuencial de la expresión de la proteína de fusión IL-12

Método	Frecuencia de clones positivos	Nivel de expresión (ng/mL)
Cotransfección	4/22	20, 22, 244, 386
Secuencial	26/37	18, 19, 19, 45, 48, 60, 67, 93, 97, 128, 177, 244, 256, 345, 348, 366, 371, 386, 504, 554, 731, 757, 821, 2000

Ejemplo 5: Expresión de proteínas de fusión IL-12 de una sola cadena

Los métodos que se acaban de describir para la producción de anticuerpo dimérico y proteínas de fusión con base en Fc también se pueden utilizar en su forma más simple para expresar proteínas de fusión de cadena sencilla con IL-12 (aquellas que no forman dímeros). En este caso, se una secuencia que codifica un solo polipéptido a la secuencia para la subunidad p35 y coexpresada en la misma célula que la subunidad p40 libre. Cualquiera de los dos métodos, la transfección simultánea o secuencial, se pueden utilizar para producir proteínas de fusión heterodiméricas de una sola cadena. El propósito de tales proteínas de fusión puede ser o bien dirigir IL-12 a una célula que porta el antígeno, a través de la fusión de un anticuerpo Fv de una sola cadena (Fv-sc) (Huston y Oppermann, WO 88/09344) o combinar el efecto inmunoestimulador muy específico de IL-12 junto con un antígeno proteico como adyuvante. El enlazamiento de la proteína estimuladora y del antígeno asegura su colocalización después de la inyección en un animal. El antígeno puede ser cualquier polipéptido. Estos pueden inducir anticuerpos en animales capaces de reaccionar con antígenos tumorales, virales o de otro tipo que tienen valor terapéutico. Por ejemplo, Fv-sc se puede utilizar ya que es a menudo ventajoso para inducir respuestas inmunitarias a regiones V de anticuerpos que incluyen el idiotipo (región específica de unión al antígeno) con la finalidad de estimular redes de idiotipos.

El tipo de antígeno usado para dichas proteínas de fusión puede ser también uno que normalmente induce una respuesta alérgica, tal como el Der p I y Der p II de ácaros del polvo, o tropomiosina de varios tipos de mariscos, que pueden fusionarse a nivel del ADN a la subunidad p35 de IL-12 y se expresan en la misma célula con la subunidad p40. La inmunización con dichas proteínas de fusión inducirá fuertes respuestas de células auxiliares de Th1 que serían útiles en la desensibilización de la respuesta de Th2 causante de enfermedades en pacientes atópicos con alergia.

Para demostrar la expresión de una proteína de fusión de una sola cadena, se construyó una versión de Fv-sc del anticuerpo KS-1/4. El extremo 5' de la porción que codifica la proteína del gen de fusión (un fragmento XbaI hasta Af1II) consiste en una secuencia líder derivada de una cadena ligera k de ratón, fusionada a la secuencia de la proteína madura de la región V de la cadena L de KS-1/4. El extremo de la región V se fusiona, en el marco, a un

ADN que codifica la secuencia enlazadora simple, (Gly₄Ser)₃, descrita por otros (Huston y Oppermann, WO 88/09344) seguida, en el marco, por la secuencia que codifica la región V de cadena H de KS-1/4. El extremo 3' de esta Fv-sc contiene un sitio XmaI, compatible con la unión al extremo 5' de las versiones humana y de ratón (fragmentos XmaI hasta XhoI) de la subunidad p35 de IL-12. Los fragmentos finales XbaI hasta XhoI se insertaron en los sitios correspondientes del mismo vector de expresión (pdC) utilizado para expresar las subunidades IL-12 libres para obtener los vectores pdC-SCA-hu-p35 y pdC-SCA-mu-p35.

Estos vectores se introdujeron en una línea celular que expresa p40 humana y se cultivaron en medio que contenía metotrexato (0,1 µM). Se identificaron los clones que expresan proteína de fusión, resistentes a fármacos mediante ensayos de ELISA específicos para la especie de p35 utilizada en el constructo (es decir, se utilizó un anticuerpo p40 humano de IL-12 para la captura de antígeno y se utilizaron para la detección anticuerpos específicos anti-ratón o p35 humana). Se utilizaron los medios de cultivo de cada tipo de proteína de fusión de una sola cadena para determinar sus cantidades de manera que se pudieron calcular las actividades específicas relativas. Se analizaron las diluciones en serie de cada muestra para determinar la capacidad de inducir la secreción de IFN-γ como se detalló anteriormente en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la FIG. 6, que compara la actividad de las proteínas de fusión de IL-12 de una sola cadena elaboradas ya sea con subunidades humanas o con p35 de ratón y p40 humana, así como la especificidad de especie de las proteínas de fusión. Los datos muestran que la proteína de fusión de una sola cadena de IL-12 humana es tan activa como las fusiones completas de anticuerpos en su capacidad para inducir IFN-γ, pero que no es tan potente como el estándar de IL-12 humana cuando se utilizaron PBMC humanas (FIG. 6A). La forma híbrida humana/de ratón fue aproximadamente 50 veces menor que el control de IL-12 de ratón como se observó con el constructo de anticuerpo completo (FIG. 6B). La FIG. 6C muestra un ensayo de unión a antígeno de las proteínas de IL-12 de una sola cadena. Se recubrieron las placas con el antígeno KS reconocido por el anticuerpo KS-1/4 y se utilizó para capturar cualquier proteína de fusión de anticuerpo o anticuerpo reactivo. Después de lavar varias veces, se detectó la proteína de fusión unida usando un anticuerpo p40 de IL-12 anti-humano. Los datos muestran que las proteínas de fusión de una sola cadena se unieron a la placa recubierta de antígeno y se pudieron detectar con un anticuerpo contra IL-12, demostrando así que las moléculas fusionadas retienen actividad de unión al antígeno.

La intensidad de la unión fue aproximadamente 3 veces más baja que la observada con el anticuerpo KS-1/4 completo, pero esto no es inesperado, debido a la monovalencia del constructo de una sola cadena. Los resultados de actividad tanto con el anticuerpo completo como con proteínas de fusión de IL-12 de una sola cadena sugieren que el terminal amino de la cadena de p35 puede ser importante para la unión al receptor ya que las fusiones parecen reducir la actividad. No obstante, las moléculas de anticuerpo-IL-12 son todavía inductores muy potentes de IFN-γ a concentraciones superiores a 1 ng/mL. Se espera que la concentración de dichas moléculas en animales tratados sea varios órdenes de magnitud más alta que esto, tanto en la circulación, como en el sitio objetivo de acción.

Una posible forma de aumentar la actividad específica de proteínas de fusión anticuerpo-IL-12 sería insertar un enlazador peptídico flexible entre las secuencias del anticuerpo y de p35 dando así más libertad a las secuencias del terminal amino de esta subunidad. Una secuencia tal como la del enlazador (Gly₄Ser)₃, descrito anteriormente, se podría utilizar de esta manera. Un posible problema con este enfoque es que tal enlazador podría ser inmunógeno, especialmente cuando se fusiona a un potente estimulador inmune tal como IL-12.

Ejemplo 6: Propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión de IL-12

Se analizaron las proteínas de fusión anticuerpo-IL-12 para determinar su comportamiento farmacocinético después de inyección intravenosa en ratones Balb/c. Se extrajo sangre de los ratones mediante sangrado retro-orbital y se almacenó a 4°C en tubos Eppendorf de microcentrífuga. Se utilizaron métodos ELISA para medir la cantidad de anticuerpo humano, así como la cantidad de proteína de fusión intacta de IL-12, que queda en la sangre en puntos de tiempo cada vez mayores. El primer ELISA que mide anticuerpo humano utiliza un anticuerpo contra cadenas H y L humanas para captura y un anticuerpo Fc antihumano para detección. El ensayo específico de la proteína de fusión utiliza la misma primera etapa de captura, pero un anticuerpo anti-subunidad p40 para la detección. Como se muestra en la FIG. 7, tanto el anticuerpo como la proteína de fusión de IL-12 tenían una vida media prolongada, pero la vida media de la proteína de fusión fue algo más corta. Esto sugiere que la proteína de fusión en circulación se escinde en el tiempo para liberar IL-12 mientras que el anticuerpo permanece en la circulación. Los experimentos reportados al comienzo con otras proteínas de fusión anticuerpo-citoquina demuestran que las citoquinas pueden ser liberadas mediante escisión de la proteasa. Véase, Gillies, y colaboradores, Bioconj. Chem. 4: 230-235 (1993). No obstante, las vidas medias de las proteínas de fusión son mucho más prolongadas que el valor de 3 h reportado para IL-12 nativa. De hecho, la concentración en suero a las 72 horas es todavía mucho mayor que el nivel requerido para inducir la secreción de IFN-γ. Trincieri, Blood 84: 4.008-4.027 (1992).

Ejemplo 7: Tratamiento de carcinoma de colon establecido con la proteína de fusión anticuerpo-IL-12.

El carcinoma de colon murino, CT26, es particularmente insensible al tratamiento con la administración sistémica de IL-12 de ratón en dosis no tóxicas. Martinotti, y colaboradores, Eur. J. Immunol. 25: 137-146 (1995). Se ha

encontrado alguna eficacia cuando se ha combinado la administración sistémica de IL-12 junto con vacunación repetida de células CT26 irradiadas, modificadas por ingeniería genética para secretar IL-2. Vagliani, y colaboradores, *Cancer Res.* 56: 467-470 (1996). Un enfoque alternativo para una terapia exitosa implicó las células CT26 modificadas genéticamente para segregar bajos niveles de IL-12. Esto fue ineficaz salvo que los ratones fueran tratados primero con anticuerpos para agotar las células CD4⁺, Martinotti, y colaboradores, *Eur. J. Immunol.* 25: 137-146 (1995), presumiblemente debido a un efecto inmunosupresor de estas células después de la exposición a los tumores modificados por ingeniería genética *in vivo*. Incluso otro enfoque de modificar por ingeniería genética secretores de IL-12 mucho mayores fue mucho más exitoso, indicando así que la cantidad de IL-12 local era crítica en el establecimiento de una respuesta inmune a los tumores subcutáneos, Colombo, y colaboradores, *Cancer Res.* 56: 2531-2534 (1996). En este caso, sin embargo, no hubo demostración del tratamiento de tumores establecidos, diseminados, similar a la que se observaría en el entorno clínico. El propósito del presente experimento fue evaluar la eficacia de las proteínas de fusión anticuerpo-IL-12 para el tratamiento de carcinoma de colon murino, CT26.

Las células CT26 fueron transfectadas con un ADNc que codifica el antígeno reconocido por el anticuerpo KS-1/4, que se denomina ya sea como antígeno KS (KSA) o molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM). Los clones que expresan esta proteína en su superficie fueron identificados mediante análisis de inmunocoloración con KS-1/4 y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células de un clon, que expresan de forma estable KSA (clon 21.6), fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones Balb/c (1×10^5 por ratón). Los ratones no tratados formaron una metástasis pulmonar extensa el día 28 y murieron dentro de los 40 días después de la inoculación. Esta tasa de crecimiento fue prácticamente la misma que la de las células parentales lo que indica que la expresión de la KSA humano no tenía efecto sobre la inmunogenicidad de CT26 o la capacidad de formar tumores.

La eficacia de la proteína de fusión anticuerpo-IL-12 para la terapia de metástasis de CT26 fue probada en este modelo de ratón utilizando la forma híbrida humana/ratón que tiene actividad sobre las células de ratón. Después de la inyección de células tumorales, los ratones recibieron inyecciones ya sea de PBS (sin control de tratamiento), la proteína de fusión KS-1/4-IL-2 (control positivo), anticuerpo KS-1/4 con IL-2 libre (control negativo) o la proteína de fusión KS-1/4-IL-12 (muestra de ensayo).

El tratamiento comenzó el día 4, un momento en que las metástasis establecidas son fácilmente detectables por tinción histológica en los pulmones de los animales, y continuó diariamente durante 5 días. En el día 28 después de la inoculación de células tumorales, los animales fueron sacrificados y sus pulmones examinados por la presencia del tumor. También se midieron los pesos de los pulmones para determinar la cantidad de masa tumoral, con respecto a los ratones libres de tumor. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Los animales no tratados tenían enfermedad metastásica extensa caracterizada por un cubrimiento superficial casi completo del órgano con tumor a través de la fusión de nódulos metastásicos individuales. Los pesos de los pulmones aumentaron en un promedio de tres veces, indicando que las masas tumorales en realidad formaban la mayor parte del órgano. Los animales tratados tenían poca o ninguna evidencia de metástasis, con algunos animales completamente libres de tumor. Ninguno de los animales mostró signos manifiestos de toxicidad durante el proceso de tratamiento. Por lo tanto, a diferencia del tratamiento con IL-12 sistémico, la terapia de proteína de fusión anticuerpo-IL-12 puede erradicar el carcinoma de colon CT26 metastásico establecido.

Tabla 2: Tratamiento de metástasis de pulmón del carcinoma de colon murino en ratones SCID con proteínas de fusión anticuerpo-IL-12

Tratamiento	Puntuación metastásica	Peso del órgano
PBS	3, 3, 3, 3, 3, 3	0,52
Hu-KS1/4	3, 3, 3, 3, 3	0,48
Hu-KS1/4 + IL-2	3, 3, 3, 3, 3	0,40
Hu-KS- IL-2	2, 1, 1, 1, 1	0,22
Hu-KS- IL-12	1, 1, 1, 1, 1	0,20

Las metástasis pulmonares experimentales fueron inducidas mediante inyección intravenosa de 10^5 células CT26-KSA. El tratamiento comenzó tres días después con inyección intravenosa de 10 µg del anticuerpo KS-1/4 humanizado o la proteína de fusión indicada durante cinco días consecutivos. Los animales fueron sacrificados y se determinó la puntuación metastásica por el grado de cobertura de la superficie: 0 = sin focos metastásicos visibles; 1 = menos de 5% de la superficie cubierta; 2 = 5 a 50% de la superficie cubierta; y 3 = más de 50% de la superficie

pulmonar está cubierta con focos metastásicos.

Ejemplo 8: Proteínas de fusión de IL-12 como vacunas

5 La proteína de fusión IL-12-anticuerpo KS-1/4 humanizado en regulador de PBS, elaborada con la subunidad p35 de murino (HuKS-1/4-mIL-12), fue inyectada en ratones Balb/c por vía intravenosa (5 µg/día x 5). Los ratones de control recibieron el mismo anticuerpo, en las mismas cantidades, pero sin IL-12 adjunta. Ni la solución de la inyección contenía cualquier otro tipo de adyuvante. En el día 10, se recolectaron muestras de sangre en tubos de microcentrífuga por sangrado retro-orbital y se preparó plasma recogiendo muestras de sangre en tubos de plástico que contenían citrato de sodio, seguido de centrifugación a velocidad máxima en una microcentrífuga Eppendorf de mesa. Se recubrieron las placas de ELISA (96 pozos) con la región constante humana que contenía la proteína HuKS-1/4 y se utilizaron para capturar cualquier anticuerpo de ratón elaborado en respuesta a la inmunización. Después de retirar por lavado el material no enlazado, se detectaron los anticuerpos de ratón enlazados con anticuerpo Fc antirratón de cabra (Jackson ImmunoResearch) acoplado a peroxidasa de rábano picante. Cualquier de los anticuerpos enlazados podría ser dirigido a cualquiera de las regiones constantes humanas o la región variable, las cuales se reparten entre la HU-KS-1/4 y las proteínas de fusión.

15 Como se muestra en la FIG. 8, hubo poca o ninguna reactividad a Hu-KS-1/4 sin IL-12 fusionada. La proteína de fusión, por otro lado, induce una fuerte respuesta de anticuerpos en ausencia de adyuvantes exógenos y a pesar del hecho de que la vía intravenosa de administración es altamente desfavorable para inducir tales respuestas, en comparación ya sea con la administración subcutánea o intraperitoneal. Los anticuerpos del isotipo IgG2a, que son típicos de las respuestas mejoradas de IL-12, fueron observados en el grupo inyectado con anticuerpo-IL-12, pero no en el grupo inyectado con el anticuerpo Hu-KS-1/4.

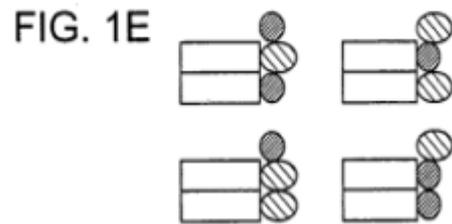
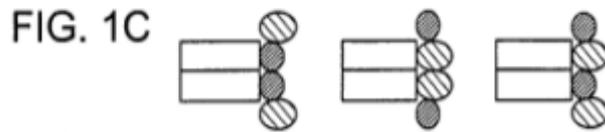
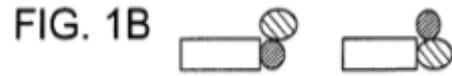
25 La inmunogenicidad de las proteínas de fusión de IL-12 administradas por diversas vías se prueba mediante la inyección de una solución de la proteína de fusión (tal como la descrita anteriormente) en PBS u otro regulador biocompatible, o un adyuvante conocido tal como adyuvante completo o incompleto de Freund. Por ejemplo, se pueden suministrar inyecciones subcutáneas, intradérmicas o intraperitoneales únicas o múltiples cada dos semanas. Alternativamente, la proteína de fusión puede administrarse primero por inyección subcutánea y luego seguida por inyección intraperitoneal. El adyuvante de Freund no puede ser utilizado para uso humano, debido a la irritación en el sitio de la inyección. Adyuvantes alternativos tales como precipitados de hidróxido de aluminio (Alumbre) están aprobados para uso humano y pueden ser utilizados en la presente invención. Se pueden usar también nuevos adyuvantes químicos orgánicos con base en escualenos y lípidos para inyecciones en la piel.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión heterodimérica que comprende una primera y una segunda cadena quimérica unida por un enlace disulfuro, comprendiendo cada cadena quimérica una subunidad p35 o p40 de la citoquina heterodimérica IL-12 unida por un enlace peptídico a una porción de una cadena pesada de Ig, estando la subunidad de una de las cadenas heterodiméricas unida además por un enlace disulfuro a la subunidad diferente de la citoquina heterodimérica, en donde la subunidad de una de las cadenas heterodiméricas, unida a la cadena pesada de Ig mediante un enlace peptídico, es p35.
- 10 2. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la subunidad de la primera cadena quimérica y la subunidad de la segunda cadena quimérica están unidas cada una a la cadena pesada de Ig mediante un enlace peptídico es p35.
3. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la subunidad de la primera cadena quimérica enlazada a la cadena pesada de Ig por un enlace peptídico es p35, y la subunidad de la segunda cadena quimérica enlazada a la cadena pesada de Ig por un enlace peptídico es p40.
- 15 4. Una proteína de fusión de la reivindicación 2 o 3, en donde la subunidad, que está enlazada por un enlace disulfuro a la subunidad diferente, es p40.
5. Una proteína de fusión de la reivindicación 3, en donde la subunidad, que está enlazada por un enlace disulfuro a la subunidad diferente, es p35.
6. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde la cadena pesada comprende un dominio CH1, un CH2 y un CH3.
- 20 7. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende regiones variables específicas para un epítipo en una célula objetivo.
8. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, que comprende una cadena ligera de Ig, que se combina con dicha cadena pesada quimérica de Ig, formando de esta manera un sitio funcional de enlazamiento al antígeno.

25



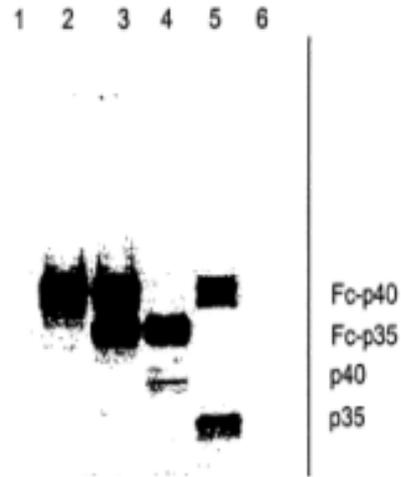


FIG. 2

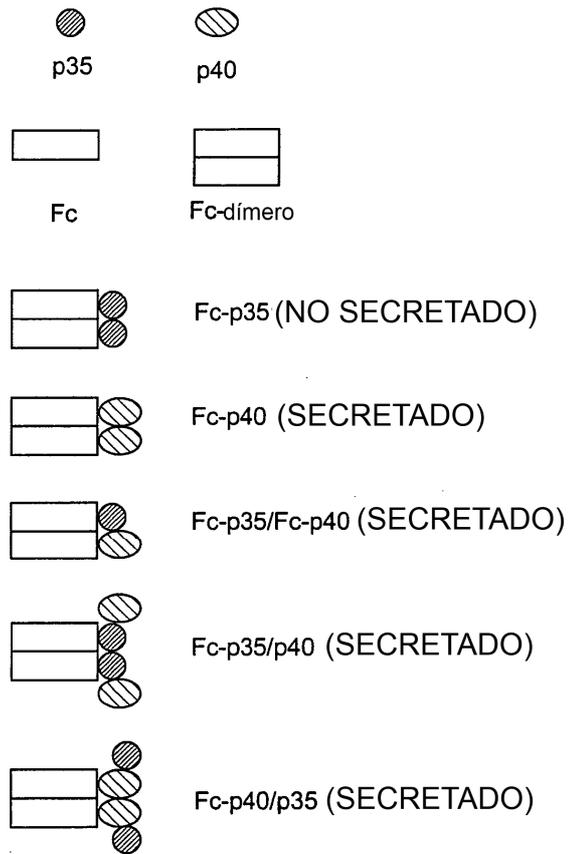
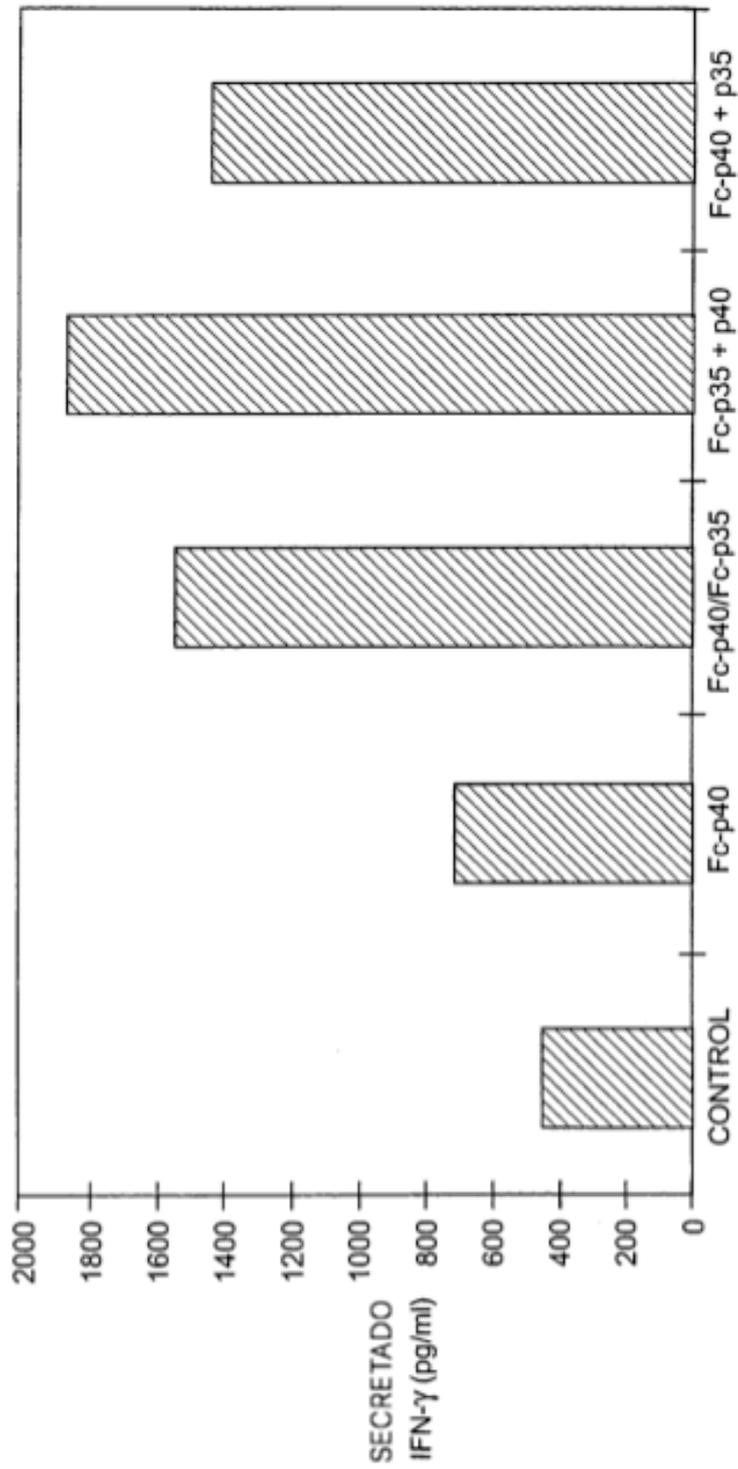


FIG. 3



CONSTRUCTO ANALIZADO

FIG. 4

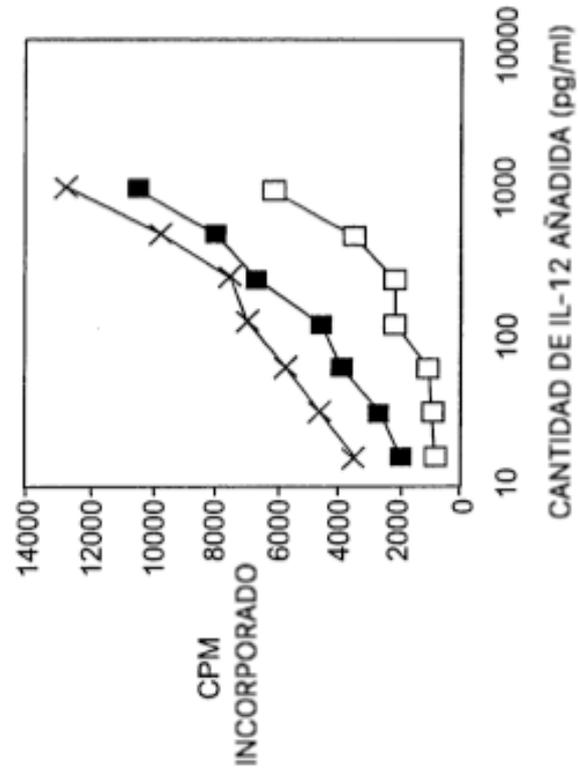


FIG. 5B

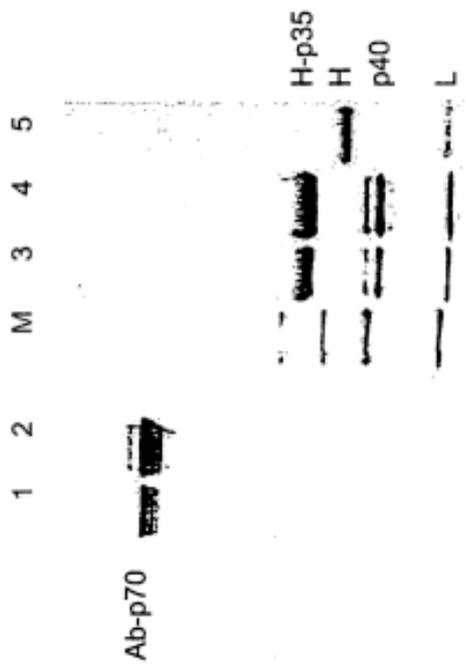


FIG. 5A

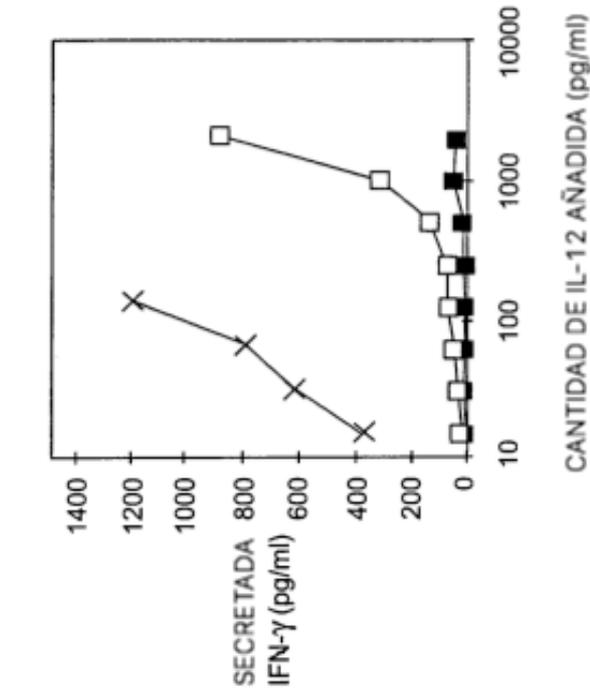


FIG. 5D

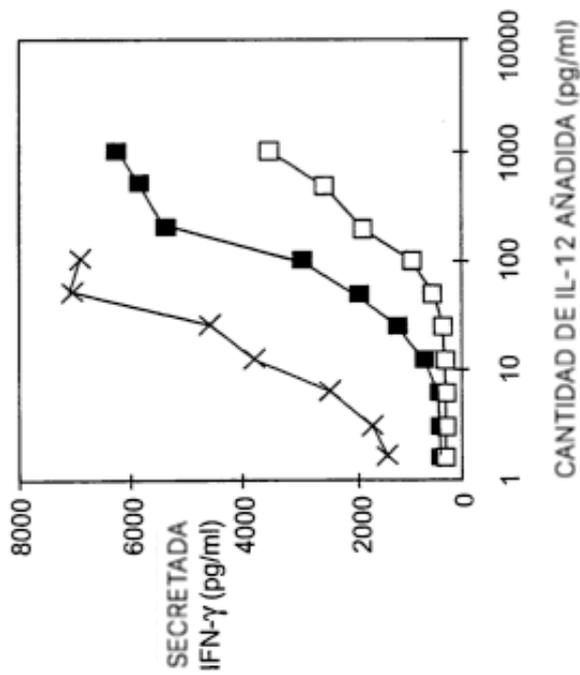


FIG. 5C

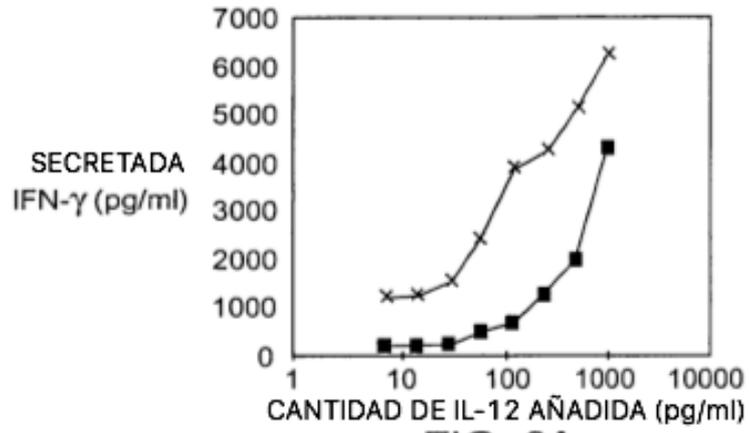


FIG. 6A

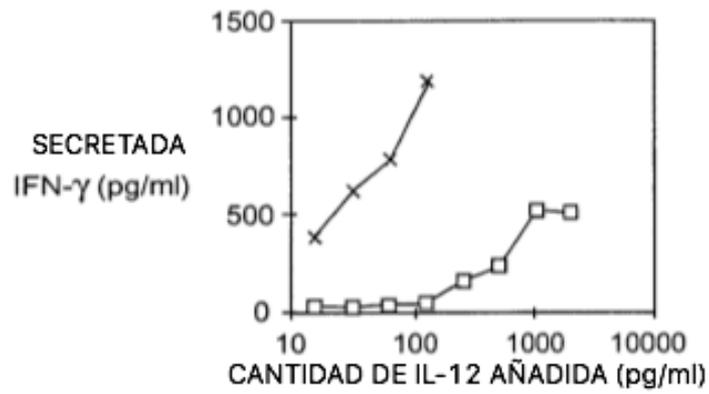


FIG. 6B

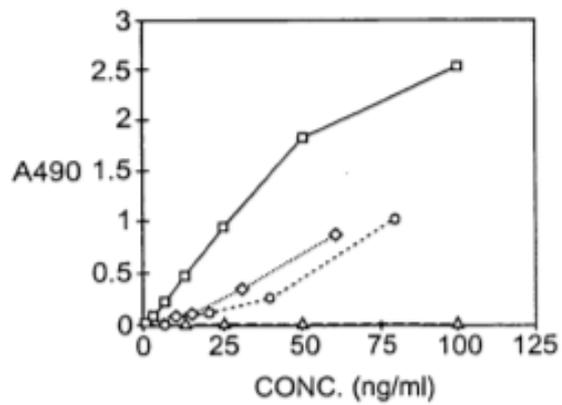


FIG. 6C

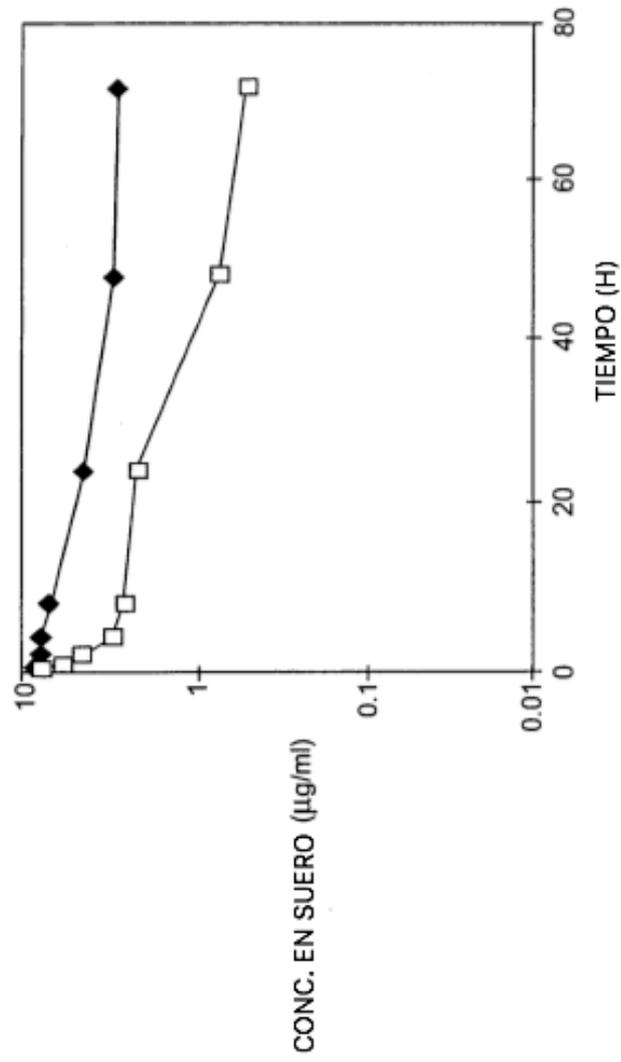


FIG. 7

