

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 490**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2007 PCT/EP2007/004044**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2007 WO07128563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2007 E 07724968 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2016098**

54 Título: **Citocinas dirigidas por anticuerpos para terapia**

30 Prioridad:

**08.05.2006 EP 06009456**

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

**24.03.2017**

73 Titular/es:

**PHILOGEN S.P.A. (100.0%)  
LA LIZZA 7  
53100 SIENA, IT**

72 Inventor/es:

**NERI, DARIO;  
KASPAR, MANUELA y  
TRACHSEL, EVELINE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 606 490 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

Citocinas dirigidas por anticuerpos para terapia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo que tienen afinidad de unión específica o bien a dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B) o bien a al menos uno de los dominios extracelulares de tenascina oncofetal fusionado a citocina-IL-10, fragmentos funcionales y derivados funcionales de la misma. La invención también se refiere al uso de al menos una de dichas proteínas de fusión para la fabricación de un medicamento. En particular, la invención se refiere al uso de dicho medicamento para el tratamiento de tumores o enfermedades inflamatorias crónicas tales como aterosclerosis, artritis y psoriasis.

15 **Antecedentes relevantes de la invención**

Las citocinas son proteínas inmunomoduladoras, algunas de las cuales se han usado de manera preclínica y clínica no solo para combatir el cáncer, sino también para interferir con estados inflamatorios crónicos y con enfermedad infecciosa.

El potencial terapéutico de las citocinas recombinantes se ve limitado a menudo por efectos secundarios graves incluso a bajas concentraciones, impidiendo por tanto concentraciones de citocinas suficientes de los tejidos diana. Recientemente, se han empleado anticuerpos monoclonales para dirigir y administrar citocinas a sitios de enfermedad para aumentar su potencia y evitarle al tejido normal los efectos tóxicos. De hecho, ya se han investigado varias proteínas de fusión anticuerpo-citocina para su aplicación en la terapia contra el cáncer, a menudo con resultados excelentes. Por ejemplo, el anticuerpo humano L19 específico para el dominio ED-B de fibronectina (un marcador de angiogénesis) se ha usado para administrar citocinas proinflamatorias (tales como IL-2, IL-12 o TNF) a tumores sólidos, algunas veces con beneficios terapéuticos sorprendentes [para una revisión y referencias correspondientes véase Neri & Bicknell, *Nat. Rev. Cancer* (2005) 5: 436-446, y también el documento WO 01/62298]. Sin embargo, muchas citocinas tienen una historia de fracaso clínico, tanto cuando se usan como un agente individual o como parejas de fusión con anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, IL-2 recombinante ("Proleukin", Chiron) se ha aprobado para el tratamiento de pacientes con carcinoma de células renales pero las tasas de respuesta son normalmente bajas (generalmente por debajo del 20%) para esta indicación e incluso inferiores para los otros tipos de cáncer. Otras citocinas (tales como interleucina-12 o interleucina-10, véase a continuación) no han podido demostrar eficacia sustancial en una serie de estudios clínicos, lo que ha ralentizado los programas de desarrollo clínico. Estas citocinas aún no se han aprobado como productos farmacéuticos. Interferón gamma es otro ejemplo de una citocina aprobada para una indicación muy limitada (tratamiento de enfermedad granulomatosa crónica, Genentech) que no ha podido demostrar beneficios clínicos sustanciales para otras indicaciones.

Incluso cuando se fusionan a anticuerpos, un aumento sorprendente en el índice terapéutico es impredecible. Por ejemplo, la fusión anticuerpo anti-GD2-IL2 EMD273063 no pudo demostrar beneficios terapéuticos sustanciales en varios ensayos clínicos, el último pero no menos importante un ensayo en niños con neuroblastoma (Osenga *et al.*, *Clin. Cancer Res.* Mar 15; 12(6):1750-9 (2006)).

La interleucina-10 (IL-10) es una citocina homodimérica producida por monocitos activados y células T que está implicada profundamente en la regulación de respuestas inflamatorias y reacciones inmunitarias. Su función global principal se describe de la mejor manera como un amortiguador de respuestas inmunitarias, pero IL-10 también presenta actividades estimuladoras. IL-10 se describió por primera vez como factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF), una actividad producida por células Th2 de ratón que inhibía la activación de y la producción de citocinas por células Th1 [Fiorentino *et al.*, *J. Exp. Med.* 170(6): 2081-95 (1989)]. El gen que codifica para IL-10 humana está ubicado en el cromosoma 1 [Kim *et al.*, *J. Immunol.* 148(11): 3618-23 (1992)] y se traduce en una proteína compuesta por 160 aminoácidos con una masa molecular de 18,5 kDa. IL-10 humana es activa como homodímero no unido por disulfuros de 37 kDa [Syto *et al.*, *Biochemistry* 37(48): 16943-51 (1998)].

IL-10 se ha considerado un candidato atractivo para uso terapéutico basándose en sus potentes actividades inmunomoduladoras *in vitro* y efectos demostrados en modelos animales de inflamación crónica y aguda, autoinmunidad, cáncer y enfermedad infecciosa. Schering-Plough desarrolló IL-10 humana recombinante (ilodecaquina, Tenovil<sup>®</sup>) para ensayos clínicos. La proteína se produce en *E. coli* y consiste en 161 aminoácidos, idénticos a la proteína humana endógena excepto por un residuo de metionina en el extremo amino-terminal. Se han realizado ensayos clínicos de fase I y II que investigan la seguridad, tolerancia, farmacocinética, farmacodinámica, efectos inmunológicos y hematológicos de dosis individuales o múltiples de IL-10 administradas por vías intravenosa o subcutánea en diversos entornos en voluntarios sanos y poblaciones de pacientes específicas [Moore *et al.*, *Annu Rev. Immunol.* 19: 683-765 (2001)]. Aunque se ha interrumpido el desarrollo clínico debido a la falta de eficacia del compuesto. Recientemente, se han presentado datos que pueden explicar, al menos en parte, el dilema de la terapia con IL-10. Tilg *et al.* encontraron que altas dosis de IL-10 regulan por incremento la producción de IFN-gamma y

neopterina, contrarrestando de ese modo sus propiedades inmunosupresoras. Los autores concluyeron que la acción terapéutica de hL-10 administrada de manera sistémica se ve limitada por los efectos proinflamatorios de la citocina y sugieren que este problema puede sortearse mediante enfoques que dan como resultado administración eficaz a la mucosa sin provocar un aumento en las concentraciones sistémicas de IL-10 [Tilg *et al.*, Gut 50(2): 191-5 (2002)].

La interleucina-15 (IL-15) es un miembro de 14 a 15 kDa de la familia de citocinas de haz de 4 hélices  $\alpha$  compuesta por 114 aminoácidos. En particular, la proteína IL-15 se regula postranscripcionalmente mediante múltiples elementos de control que inhiben la traducción, incluyendo 12 AUG en el sentido de 5' de la región no traducida (UTR) en 5', 2 péptidos señal poco comunes (el péptido corto con 21 aminoácidos permanece dentro de la célula, el péptido largo con 48 aminoácidos es para la secreción) y el extremo C-terminal de la proteína madura [Bamford *et al.*, J. Immunol., 160(9): 4418-26 (1998)]. Hay una identidad de secuencia del 97% entre IL-15 de ser humano y simio y el 73% entre ser humano y ratón. Esto parece ser suficiente para que hL-15 sea biológicamente activa en células de simio y murinas. IL-15 usa dos receptores y rutas de señalización distintos: Un sistema de IL-15R de alta afinidad que consiste en subunidades IL-2/15 $\beta$ ,  $\gamma_c$  e IL-15R $\alpha$  se expresa en células T y NK. Las subunidades IL-2/15R  $\beta$  y  $\gamma_c$  se comparten con el receptor de IL-2 [Giri *et al.*, EMBO J., 3(12):2822-30 (1994)]. Los mastocitos responden a IL-15 con un sistema de receptor que no comparte elementos con el receptor de IL-2 sino que usa una subunidad IL-15RX de 60 a 65 kDa novedosa. Una variedad de tejidos tales como placenta, músculos esqueléticos, riñón, fibroblastos, células epiteliales, células dendríticas y monocitos expresan IL-15.

IL-15 estimula la producción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo TNF $\alpha$ , IL-1, IFN $\gamma$ ), la proliferación y la síntesis de Ig de células B activadas, la activación de T<sub>H</sub>1, monocitos y células citotóxicas activadas por linfocinas, la proliferación de mastocitos y células T e inhibe la apoptosis de células T y B. Además de las actividades funcionales mencionadas, IL-15 desempeña un papel fundamental en el desarrollo, la supervivencia y la función de células NK [Joost J. Oppenheim *et al.*, Cytokine Reference; 213-221, (2002)]. Estudios *in vivo* demostraron que IL-15 exógena potencia la actividad antitumoral de células T CD8<sup>+</sup> reactivas con tumores [Fehniger *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev., 13(2):169-83 (2002)].

Se han notificado niveles anómalos altos de expresión de IL-15 en enfermedades inflamatorias, neoplásicas y enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple [Joost J. Oppenheim *et al.*, Cytokine Reference; 213-221, (2002)].

Debido a que IL-2 e IL-15 usan las mismas subunidades de receptor, comparten muchas características. Las principales diferencias son sus sitios de síntesis y secreción. IL-2 se produce por células T activadas. En cambio, IL-15 se expresa en una variedad de tejidos tal como se mencionó anteriormente. Mientras que IL-2 puede promover la apoptosis y limitaba la supervivencia y proliferación de células T de memoria CD8<sup>+</sup>, IL-15 ayuda a mantener la población de CD8<sup>+</sup> de memoria y puede inhibir la apoptosis. Se ha mostrado que IL-15, aunque inicialmente se pensaba que mediaba en efectos biológicos similares que IL-2, tiene propiedades únicas en estudios básicos y preclínicos que pueden ser beneficiosas en la inmunoterapia de cáncer [Fehniger *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev., (2):169-83 (2002)]. Además, el perfil de toxicidad de IL-15 se asemeja al de IL-2 muy estrechamente [Munger *et al.*, Cell Immunol., 5(2):289-93 (1995)], lo que sugiere por tanto que la administración dirigida de IL-15 es superior a la administración sistémica en cuanto al índice terapéutico.

Estudios para identificar los epítopos de IL-15 que son responsables de la unión al receptor de IL-15 revelaron mutantes de IL-15 que mostraban propiedades o bien agonistas o bien antagonistas que pueden ser útiles como agentes terapéuticos [Bernard *et al.*, J. Biol. Chem., 279(23): 24313-22 (2004)]. Los mutantes de IL-15 IL-15D8S e IL-15Q108S eran inactivos en un bioensayo de CTLL-2, pero pudieron inhibir de manera competitiva la actividad biológica de IL-15 no modificada [Pettit *et al.*, J. Biol. Chem, 272(4): 2312-8 (1997)].

El gen 7 asociado a diferenciación de melanoma (mda-7 = IL-24) se identificó por primera vez en la década de 1990 como consecuencia de su propiedad de inducirse durante la diferenciación de melanoma. Es un miembro de la familia de citocinas IL-10. El ADNc del gen de IL-24 codifica para una proteína de 206 aminoácidos con 23,8 kDa. En células humanas, la proteína secretada tiene un peso molecular significativamente más alto (40 kDa) debido a la fuerte N-glicosilación en comparación con la proteína intracelular (30/23 kDa). La homología de IL-24 humana con el homólogo de ratón (MOB-5) es del 68% y con la de ratón (FISP) del 69%. Hay dos receptores heterotriméricos funcionales para IL-24: IL-20R1/IL-20R2 e IL-22R1/IL-20R2 [Wang *et al.*, Genes Immun., 5(5):363-70 (2004)], [Chada *et al.*, Mol. Ther., 10(6):1085-95 (2004)]. Aunque las cadenas de los receptores IL-20R1 e IL-22R1 se expresan ampliamente, la expresión restringida de la IL-20R2 común en determinados tejidos no hematopoyéticos sugiere un papel pleiotrópico de IL-24 fuera del sistema hematopoyético [Wolk *et al.*, J. Immunol., 168(11): 5397-402 (2002)]. IL-24 se expresa por monocitos, células T, células dendríticas y melanocitos. IL-24 induce la secreción de IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1- $\beta$  y GM-CSF, lo que indica su función como citocina pro-Th1. IL-10 (citocina Th2) inhibe la actividad de IL-24.

La cantidad de depósito de IL-24 se correlaciona de manera inversa con la progresión del melanoma. Estos hallazgos conducen a la hipótesis de que la producción de mda-7 se pierde durante la invasión del melanoma, lo que

sugiere un papel de IL-24 como supresor de tumores [Chada *et al.*, *Mol. Ther.*, 10(6):1085-95 (2004)].

La expresión de IL-24 en tumores puede promover la presentación de antígenos mediante la activación o estimulación de células efectoras y auxiliares inmunitarias [Chada *et al.*, *Mol. Ther.*, 10(6):1085-95 (2004)].

Un gran conjunto de datos demuestra que la sobreexpresión del gen de IL-24 usando o bien vectores de plásmido o bien un adenovirus de replicación defectuosa da como resultado supresión del crecimiento e inducción de apoptosis a través de la activación de rutas de señalización intracelulares en una amplia gama de células cancerosas. Esta clase de transferencia génica presenta toxicidad mínima en células normales al tiempo que induce una apoptosis potente en una variedad de células cancerosas [Sieger *et al.*, *Mol. Ther.*, 9(3):355-67 (2004)]. Un ensayo clínico de aumento en escala de la dosis de fase I, en el que se administraron constructos adenovirales que expresan la IL-24 a 22 pacientes con cáncer avanzado, dio como resultado expresión de IL-24, inducción de apoptosis en todos los tumores y los pacientes mostraron aumentos en células T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> tras el tratamiento. [Tong *et al.*, *Mol. Ther.*, 11(1):160-72 (2005)]. Diferentes estudios de transferencia génica de IL-24 indicaron que los tumores eran más pequeños y parecían menos vascularizados en comparación con tumores de control, lo que indica actividad antiangiogénica de IL-24 [Saeki *et al.*, *Oncogene.*, 21(29): 4558-66 (2002)]. Cuando se usa mda-7 de adenovirus (Ad-mda7) debe indicarse que hay posibles inconvenientes para su aplicación en un entorno clínico: lo primero de todo, la transducción *ex vivo* de células cancerosas humanas obtenidas a partir de pacientes con cáncer con Ad-Mda7 seguido por su reintroducción en pacientes con cáncer no es práctica; en segundo lugar, la administración intratumoral de Ad-mda7 para generar una potente respuesta inmunitaria antitumoral sólo puede aplicarse a tumores localizados y no para tumores diseminados. Por tanto, es necesario desarrollar enfoques alternativos [Miyahara *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2006].

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una proteína de 141 aminoácidos (ratón) / 144 aminoácidos (ser humano) que contiene una secuencia de secreción de 17 aminoácidos. El peso molecular aparente de la proteína glicosilada madura es de 14 - 33 kDa, que es muy resistente a la desnaturalización y condiciones proteolíticas. Las actividades *in vivo* de GM-CSF están mediadas por la unión a receptores de alta afinidad que comprenden una cadena  $\alpha$  específica de GM-CSF y, para seres humanos, una subunidad  $\beta$  de transducción de señales que se comparte con los receptores de IL-3 e IL-5 [Joost J. Oppenheim *et al.*, *Cytokine Reference*, 899-908, 2002].

GM-CSF es un regulador importante del linaje de granulocitos y macrófagos. Estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de células que forman colonias hematopoyéticas de los linajes de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos. Además, mantiene la supervivencia de células que forman colonias hematopoyéticas de los linajes de células megacariocíticas y eritroides [Joost J. Oppenheim *et al.*, *Cytokine Reference*, 899-908, 2002]. También es un potente inmunostimulador con efectos pleiotrópicos, incluyendo el aumento de la presentación de Ag en una variedad de células, expresión aumentada de MHC de clase II en monocitos y amplificación de la proliferación de células T [Fischer *et al.*, *J. Immunol.*, 141(11):3882-8 (1988), Smith *et al.*, *J. Immunol.*, 144(10):3829-34 (1990), Morrissey *et al.*, *J. Immunol.*, 139(4):1113-9 (1987)].

En patología, la sobreexpresión de GM-CSF puede conducir a reacciones inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide), choque tóxico, ceguera y autoinmunidad al tiempo que niveles inferiores a los fisiológicos pueden estar implicados en algunos casos de proteinosis alveolar. La proteinosis alveolar es una enfermedad pulmonar mortal en la que proteínas tensoactivas se acumulan en el pulmón debido a un defecto en el aclaramiento mediado por macrófagos [Joost J. Oppenheim *et al.*, *Cytokine Reference*; 899-908, 2002].

En modelos animales la vacunación de ratones que llevan melanoma B16 con células tumorales irradiadas adicionales que expresan factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) murino estimuló una inmunidad antitumoral potente, duradera y específica aumentando la inmunogenicidad de los tumores [Dranoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(8):3539-43 (1993)]. Adicionalmente, GM-CSF se usa ampliamente en oncología para reducir la neutropenia relacionada con quimioterapia, una reducción de neutrófilos provocada por fármacos quimioterápicos [Danova *et al.*, *Haematologica.*, 82(5):622-9 (1997)], [Vose *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 13(4):1023-35 (1995)]. Existe un umbral por encima del cual una vacuna basada en GM-CSF no sólo pierde su eficacia sino que de manera más importante da como resultado una inmunosupresión sustancial *in vivo*. Los efectos dobles de GM-CSF están mediados por la concentración sistémica y no la local de esta citocina [Serafini *et al.*, *Cancer Res.*, 64(17):6337-43 (2004)]. Se observan acontecimientos adversos graves a dosis de 16 mg/kg al día para seres humanos [Joost J. Oppenheim *et al.*, *Cytokine Reference*; 899-908 (2002)].

Las fibronectinas son glicoproteínas adhesivas de alto peso molecular presentes en forma soluble en el plasma y otros fluidos corporales en forma insoluble en la matriz extracelular. EDB es un dominio de homología de tipo III de 91 aminoácidos que se inserta en la molécula de fibronectina mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo al nivel del transcrito primario siempre que tenga lugar la remodelación tisular [Zardi *et al.*, *Embo J.* 6(8): 2337-42 (1987)].

EDB es esencialmente indetectable en tejidos adultos sanos. Su expresión está fuertemente asociada con la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis. El dominio es abundante en muchos tumores agresivos y

dependiendo del tipo de tumor presenta patrones de expresión o bien predominantemente vasculares o bien estromales difusos [Carnemolla *et al.*, J. Cell Biol. 108(3): 1139-48 (1989)]. A pesar de su expresión muy restringida en tejidos normales y su fuerte expresión en muchos tumores sólidos, la función de EDB no parece ser indispensable debido a que los ratones que carecen del exón de EDB se desarrollan normalmente, son fértiles y se curan de fracturas óseas. Además, ratones doblemente deficientes que carecen del exón EDB y p53 no mostraron ninguna diferencia en la duración de la supervivencia en comparación con animales que expresan EDB [Fukuda *et al.*, Cancer Res 62(19): 5603-10 (2002)].

Debido a que la secuencia de EDB es idéntica en ratón, rata, conejo, perro, mono y hombre, aún no ha sido posible generar anticuerpos contra este dominio mediante tecnología de hibridoma debido a tolerancia natural. Hace unos pocos años se aislaron fragmentos de anticuerpos scFv de alta afinidad (L19) contra EDB mediante tecnología de presentación en fagos [Carnemolla *et al.*, Int. J. Cancer 68(3): 397-405 (1996); Neri *et al.*, Nat. Biotechnol. 15(12): 1271-5. (1997); Pini *et al.*, J. Biol. Chem. 273(34): 21769-76 (1998)]. L19 puede teñir vasos sanguíneos tumorales en una amplia gama de modelos tumorales experimentales en secciones de tumores humanos y otros trastornos angiogénicos [Carnemolla *et al.*, J. Cell Biol. 108(3): 1139-48 (1989); Kaczmarek *et al.*, Int. J. Cancer 59(1): 11-6 (1994); Berndt *et al.*, Histochem. Cell Biol. 109(3): 249-55 (1998)]. Castellani *et al.* han mostrado que L19 tiñe vasos sanguíneos tumorales en astrocitomas de grado III-IV pero menos del 10% de los vasos en astrocitomas de grado I-II, lo que sugiere que la expresión de EDB en estas lesiones podría usarse para la graduación de los tumores [Castellani *et al.*, Am. J. Pathol. 161(5): 1695-700 (2002)].

Debido a la conservación del antígeno, pudo investigarse el rendimiento de direccionamiento de L19 en modelos animales singénicos inmunocompetentes. Estudios de biodistribución con diferentes formatos de anticuerpos radiomarcados (scFv, inmunoproteína pequeña / SIP e IgG) mostraron una acumulación preferente de hasta el 20% de la dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g) de L19 en el sitio del tumor [Borsi *et al.*, Blood 102(13): 4384-92 (2003)]. En primer lugar, estudios de inmunocentelografía en pacientes humanos con cáncer con diacuerpo de L19 marcado con <sup>123</sup>I confirmaron que el anticuerpo también se localiza en metástasis y tumores sólidos humanos [Santimaria *et al.*, Clin. Cancer Res. 9(2): 571-9 (2003)].

El dominio EDB de fibronectina es un marcador de buena calidad de la angiogénesis, que se sobreexpresa en una variedad de tumores sólidos (por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma colorrectal, carcinoma hepatocelular, astrocitomas de grado alto, tumores de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, etc.) pero es prácticamente indetectable en tejidos adultos normales (a excepción del endometrio en la fase proliferativa y algunos vasos en los ovarios). Sin embargo, EDB se expresa sólo débilmente en la mayoría de las formas de cáncer de mama, cáncer de próstata y algunos tipos de cáncer de pulmón, estimulando por tanto la búsqueda de antígenos tumorales vasculares novedosos, que podrían usarse para la administración dirigida mediada por anticuerpos de citocinas terapéuticas a estas neoplasias.

Además de EDB, se han establecido los dominios extracelulares de tenascina oncofetal como una diana interesante en terapia. Isoformas de corte y empalme de tenascina-C se consideran dianas para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos, particularmente para las clases de tumores en los que pueden detectarse bajos niveles de EDB. La tenascina-C es una glicoproteína de la matriz extracelular. Comprende varias repeticiones de homología a fibronectina tipo 3 que pueden o bien incluirse o bien omitirse en el transcrito primario mediante corte y empalme alternativo, conduciendo a isoformas pequeñas y grandes que tienen funciones biológicas distintas. Mientras que la isoforma pequeña se expresa en varios tejidos, la isoforma grande de tenascina-C presenta un patrón de expresión más restringido. Es prácticamente indetectable en tejidos adultos sanos pero se expresa durante la embriogénesis y se expresa de nuevo en tejidos adultos que experimentan remodelación tisular incluyendo neoplasia. Su expresión se localiza alrededor de estructuras vasculares en el estoma tumoral de una variedad de diferentes tumores incluyendo carcinoma de mama, carcinoma de células escamosas oral, cáncer de pulmón, adenocarcinoma prostático, cáncer colorrectal o astrocitoma y otros tumores cerebrales. Tradicionalmente, la comunidad científica hace referencia a la isoforma grande de tenascina-C para moléculas de tenascina, que comprendería supuestamente todos los dominios que experimentaron corte y empalme alternativo, y a la isoforma pequeña de tenascina-C siempre que estos dominios estuviesen ausentes. Carnemolla y colaboradores notificaron que el dominio C que experimentó corte y empalme alternativo de tenascina-C presentaba un patrón de expresión más restringido en comparación con otros dominios que experimentaron corte y empalme alternativo. No quedó claro en ese momento si otros dominios que experimentaron corte y empalme alternativo de tenascina-C también presentaban incorporación restringida en la molécula de tenascina, y si sería más apropiado evaluar los dominios individuales que experimentaron corte y empalme por separado como dianas para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. Se emplearon satisfactoriamente anticuerpos radiomarcados específicos para los dominios A1 y D de tenascina-C en la clínica para el tratamiento de glioma y linfoma. Además, se ha demostrado clínicamente un direccionamiento eficaz al tumor por anticuerpos anti-tenascina usando un enfoque de direccionamiento previo basado en avidina/biotina o, más recientemente, con anticuerpos monoclonales específicos para la isoforma pequeña de tenascina-C. Sin embargo, todos estos anticuerpos son de origen murino y, por tanto, lo más probablemente no son adecuados para su administración repetitiva a pacientes humanos y el desarrollo de productos biofarmacéuticos. Por estos motivos se generaron anticuerpos humanos específicos frente a los dominios A1, C y D de tenascina-C usando la tecnología de fagos con anticuerpos [documento PCT/EP2005/011624 de Philogen S.p.A].

Tal como se demostró anteriormente, hay todavía mucha incertidumbre asociada en el campo con respecto a la utilidad terapéutica de citocinas en general, en particular la utilidad terapéutica de citocinas para tratar tumores y/o enfermedades inflamatorias. Aunque la técnica anterior indica esporádicamente que algunas proteínas de fusión anticuerpo-citocina específicas podrían permitir tratamiento terapéutico dirigido a la diana, no hay todavía ninguna expectativa de éxito razonable porque los resultados no son predecibles. Se le deja al experto averiguar la naturaleza de una citocina terapéuticamente útil y el efecto que tendría esta combinación con un anticuerpo o derivado del mismo. Por tanto, el experto requiere actividad inventiva para seleccionar la combinación correcta de las muchas citocinas conocidas y los muchos anticuerpos de direccionamiento conocidos porque el desenlace no puede predecirse.

El objeto de la presente invención es proporcionar sustancias terapéuticas novedosas para el tratamiento de cáncer y/o enfermedades inflamatorias, en particular para tratar psoriasis, aterosclerosis y artritis, que permiten la administración dirigida de la sustancia terapéutica a los sitios de enfermedad, lo que a su vez permite concentrar el medicamento y reducir la carga tóxica para los tejidos sanos restantes.

### Descripción de la invención

Se encontró sorprendentemente que la combinación específica de un anticuerpo que se dirige o bien al dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B) o bien a los dominios extracelulares de tenascina oncofetal fusionado a citocina IL-10, proporciona una proteína de fusión nueva y terapéuticamente eficaz.

Por tanto, el objeto anterior se soluciona proporcionando una proteína de fusión que comprende:

(i) un anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo que tiene una afinidad de unión específica o bien al dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B) o bien a al menos uno de los dominios extracelulares de tenascina oncofetal fusionado a

(ii) citocina IL-10, fragmentos funcionales y derivados funcionales de la misma.

El término "afinidad de unión específica" tal como se usa en el presente documento debe entenderse que significa que el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo se une específicamente a la proteína diana con afinidad significativa y no a otras proteínas con afinidad significativa que también se ubican en el mismo entorno, es decir sistema de ensayo u organismo, órgano, etc., *in vivo* o *in vitro*, y en las mismas condiciones, por ejemplo pH, temperatura, tampón, etc. En general, una especificidad de unión se somete a prueba realizando un ensayo de unión con una molécula diana específica y con un gran número de sustancias no relacionadas. Además, pueden usarse pruebas funcionales, inmunohistoquímica y otros procedimientos para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo especificado.

Para muchos bioensayos (por ejemplo ELISA) basados en anticuerpos, fragmentos funcionales o derivados funcionales de los mismos que pueden unirse específicamente, se requiere una constante de disociación de 1 micromolar o inferior para producir señales de unión detectables que están asociadas a menudo con un modo de unión específico. Preferiblemente, los anticuerpos, fragmentos funcionales o derivados funcionales para su uso en la presente invención tienen una afinidad de unión específica correspondiente a una constante de disociación de menos de aproximadamente 5, preferiblemente aproximadamente 1 o menos micromolar ( $\mu\text{M}$ ), de manera más preferible aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  o menos, de la manera más preferible aproximadamente 1 nM o menos o incluso 1 pM o menos.

Anticuerpos, fragmentos funcionales y derivados funcionales de los mismos para la práctica de la invención están disponibles de manera rutinaria mediante tecnología de hibridoma (Kohler y Milstein, Nature 256, 495-497, 1975), presentación de anticuerpos en fagos (Winter *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455, 1994), presentación en ribosomas (Schaffitzel *et al.*, J. Immunol. Methods, 231, 119-135, 1999) y examen en filtro de colonias iterativo (Giovannoni *et al.*, Nucleic Acids Res. 29, E27, 2001) una vez que el antígeno diana está disponible. Se conocen bien proteasas típicas para fragmentar anticuerpos para dar productos funcionales. Pueden usarse otras técnicas de fragmentación siempre que el fragmento resultante tenga una alta afinidad específica y, preferiblemente, una constante de disociación en el intervalo de micromolar a picomolar.

Se ha mostrado que el rendimiento de direccionamiento tumoral vascular de fragmentos de anticuerpos en el formato de scFv depende crucialmente (al menos para una constante de disociación de micromolar a picomolar) de la afinidad del anticuerpo por la diana. Por ejemplo, se mostró que el fragmento de anticuerpo de alta afinidad scFv(L19), específico para el dominio ED-B de fibronectina, un marcador de angiogénesis, seleccionaba como diana la neovasculatura tumoral más eficazmente que el fragmento de anticuerpo original scFv(E1), con una afinidad menor por el antígeno [Viti *et al.*, Cancer Res. 15;59(2):347-52 (1999)]. En determinados casos, la avidez de unión (por ejemplo, asociada con determinados formatos de anticuerpos homobivalentes) puede compensar una afinidad de unión monomérica moderada [Nielsen *et al.*, Cancer Res., 60(22):6434-40 (2000)].

Un fragmento de anticuerpo muy conveniente para aplicaciones de direccionamiento es el fragmento Fv de cadena sencilla, en el que se unen entre sí un dominio pesado variable y un dominio ligero variable mediante un ligador polipeptídico. Otros fragmentos de anticuerpos para aplicaciones de direccionamiento vascular incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab<sub>2</sub>, minianticuerpos (también denominados proteínas inmunitarias pequeñas), fusiones scFv-scFv en tándem así como fusiones de scFv con dominios adecuados (por ejemplo con la parte Fc de una inmunoglobulina). Para una revisión de determinados formatos de anticuerpos, véase Holliger P, Hudson PJ.; Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. Septiembre de 2005, 23(9):1126-36.).

El término "derivado funcional" de un anticuerpo para su uso en la presente invención pretende incluir cualquier anticuerpo o fragmento del mismo que se haya modificado química o genéticamente en su secuencia de aminoácidos, por ejemplo mediante adición, sustitución y/o delección de residuo(s) de aminoácido y/o se haya modificado químicamente en al menos uno de sus átomos y/o grupos químicos funcionales, por ejemplo mediante adiciones, delecciones, transposición, oxidación, reducción, etc. siempre que el derivado tenga sustancialmente la misma afinidad de unión que su antígeno original y, preferiblemente, tenga una constante de disociación en el intervalo micro-, nano- o picomolar. El derivado más preferido de los anticuerpos para su uso en la presente invención es una proteína de fusión de anticuerpo que se definirá en más detalle más adelante.

En una realización preferida, el anticuerpo, fragmento o derivado funcional del mismo para su uso en la invención es uno que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos injertados con CDR, fragmentos Fv, fragmentos Fab y fragmentos Fab<sub>2</sub> y proteínas de unión similares a anticuerpos, por ejemplo afininas, anticalinas y aptámeros.

Para una revisión de proteínas de unión similares a anticuerpos véase Binz *et al.* On engineering binding proteins from non-immunoglobulin domains en Nature Biotechnology, vol. 23, n.º 10, octubre de 2005, 12571268. El término "aptámero" describe ácidos nucleicos que se unen a un polipéptido con alta afinidad. Pueden aislarse aptámeros de un gran conjunto de moléculas de ARN monocatenarias diferentes mediante métodos de selección tales como SELEX (véase, por ejemplo, Jayasena, Clin. Chem., 45, págs. 1628 - 1650, (1999); Klug y Famulok, M. Mol. Biol. Rep., 20, págs. 97 - 107 (1994); documento US 5.582.981). También pueden sintetizarse y seleccionarse aptámeros en su forma especular, por ejemplo, como el L-ribonucleótido (Nolte *et al.*, Nat. Biotechnol., 14, págs. 1116 - 1119, (1996); Klusmann *et al.*, Nat. Biotechnol., 14, págs. 1112 - 1115, (1996)). Formas aisladas de este modo tienen la ventaja de que no se degradan por ribonucleasas que se producen de manera natural y, por tanto, tienen una mayor estabilidad.

Otra proteína de unión similar a anticuerpos y alternativa a anticuerpos clásicos son los denominados "armazones proteicos", por ejemplo, anticalinas, que se basan en lipocalina (Beste *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, págs. 1898 - 1903, (1999)). Los sitios de unión a ligando naturales de las lipocalinas, por ejemplo, de la proteína de unión a retinol o la proteína de unión a bilina, pueden cambiarse, por ejemplo, empleando un enfoque de "diseño proteico combinatorio", y en un modo tal que pueden unirse a haptenos seleccionados (Skerra, Biochem. Biophys. Acta, 1482, págs. 337 - 350, (2000)). Para otros armazones proteicos también se sabe que hay alternativas para anticuerpos (Skerra, J. Mol. Recognit, 13, págs. 167 - 287, (2000)). (Hey, Trends en Biotechnology, 23, págs. 514-522, (2005)).

Según la invención el término derivado de anticuerpo funcional pretende incluir dichas alternativas derivadas de proteínas para anticuerpos, es decir proteínas de unión similares a anticuerpos, por ejemplo afininas, anticalinas y aptámeros que reconocen específicamente al menos un dominio extracelular de fibronectina oncofetal o tenascina oncofetal.

En resumen, los términos anticuerpo, fragmento funcional y derivado funcional del mismo indican todas las sustancias que tienen la misma afinidad de unión específica o similar a uno cualquiera de los dominios extracelulares de fibronectina oncofetal o tenascina oncofetal como anticuerpo completo que tiene afinidad de unión específica a estas dianas.

Para la tenascina hay varias isoformas disponibles, por ejemplo tenascina-C, tenascina-R y tenascina-X. Para la práctica de la presente invención los dominios extracelulares de la isoforma grande de tenascina-C son los más preferidos como dianas específicas para el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo que es parte de las proteínas de fusión de la presente invención.

En una realización preferida el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo, que es parte de una proteína de fusión de la invención, tiene una afinidad de unión específica a al menos uno de los dominios extracelulares de tenascina-C oncofetal, más preferiblemente a al menos uno de los dominios extracelulares de la isoforma grande de tenascina-C.

Los dominios extracelulares de tenascina-C se indican como dominios A1, A2, A3, A4, B, C y D. Hay ya varios anticuerpos disponibles que se dirigen contra uno de estos dominios (véase Siri A. *et al.*, Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem., 14 de abril de 1995, 270(15):8650-4; Carnemolla B. *et al.*, Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a

high affinity recombinant antibody. *Am. J. Pathol.* Mayo de 1999, 154(5):1345-52; Silacci M. *et al*, Human monoclonal antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors *in vivo*. *Protein Eng. Des. Sel.* Octubre de 2006,19(10):471-8).

5 En una realización más preferida, la presente invención se refiere a proteínas de fusión de la invención que comprenden un anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo que tiene afinidad de unión específica a uno cualquiera de los dominios extracelulares de tenascina-C, es decir A1, A2, A3, A4, B, C y D, preferiblemente a uno cualquiera de los dominios A1, C o D, más preferiblemente al dominio C de tenascina-C.

10 El término "proteína de fusión" tal como se usa en el contexto de la presente invención pretende englobar todos los conjugados, en los que dicho anticuerpo, fragmento o derivado funcional se une de alguna forma a citocina IL-10, fragmentos funcionales y derivados funcionales de la misma, mediante, por ejemplo unión covalente y/o no covalente, por ejemplo enlaces iónicos. El término engloba ambas disposiciones de unión, es decir anticuerpo - citocina o citocina - anticuerpo.

15 Los términos fragmento funcional y derivado funcional con respecto a dichas citocinas han de interpretarse esencialmente en analogía a los mismos términos para anticuerpos. Fragmentos funcionales y derivados de citocinas son los que tienen esencialmente la misma función/actividad fisiológica que las citocinas que se producen de manera natural. Por ejemplo, ensayos preferidos para determinar la función/actividad de las citocinas, fragmentos y derivados de los mismos para preparar proteínas de fusión según la presente invención son:

20 La actividad/función de citocina de IL-10 o derivados funcionales de la misma puede determinarse realizando un ensayo de proliferación en mastocitos murinos MC/9. Por ejemplo, dichas células se cultivan en medio DMEM que contiene FBS al 10%, T-Stim de rata al 10% (Becton Dickinson), antibiótico al 1%, glutamina 2 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05 mM [Thompson-Snipes *et al.*, *J. Exp. Med.* 173(2): 507-10 (1991)]. Para preparar el ensayo se colocan 100  $\mu$ l de medio sin T-Stim de rata en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos con unión ultra baja (Costar® 3474) excepto para la primera fila. Se colocan 200  $\mu$ l de IL-10 humana recombinante (rhu) (100 ng/ml) o una cantidad molar equivalente de la muestra que va a someterse a prueba en los pocillos de la primera fila. Se preparan diluciones en serie 1:2 a lo largo de las filas de la placa de microtitulación transfiriendo 100  $\mu$ l de la muestra al siguiente pocillo en la fila y mezclando partiendo de la primera fila. Una fila de pocillos contiene sólo 100  $\mu$ l de medio de ensayo (sin citocina) como control negativo. Entonces se cuentan las células MC/9 y se diluyen hasta una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml. Para eliminar la citocina residual las células se lavan dos veces con medio de cultivo sin T-Stim de rata centrifugando las células, aspirando el medio y resuspendiéndolas otra vez en medio nuevo. Se añaden 100  $\mu$ l de esta suspensión celular a los pocillos de la placa de 96 pocillos ( $5 \times 10^4$  células/pocillo). Tras 48 - 72 horas, se añaden a las células 20  $\mu$ l de disolución de MTT 5 mg/ml (en PBS, filtrada), un sustrato para la deshidrogenasa mitocondrial. 4 horas después, se centrifuga la placa a 2400 g durante 10 minutos. Se aspira el medio y se lisan las células añadiendo 100  $\mu$ l de DMSO (Fluka 41641). Finalmente, se leen las placas a 570 nm. Cada concentración se realiza por triplicado.

40 En una realización preferida de la invención la proteína de fusión según la invención comprende el diacuerpo scFv L19 (largo) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

45 En otra realización preferida de la invención la proteína de fusión según la invención comprende el diacuerpo L19 (corto) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

50 En una realización adicional preferida de la invención la proteína de fusión es una en la que el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo que tiene afinidad de unión específica a al menos uno de los dominios extracelulares de tenascina oncofetal se selecciona del grupo que consiste en F16 (largo), F16 (corto), F16 (A34M) (largo), F16 (A34M) (corto), G11 (largo) y G11 (corto) que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 8 a 13, respectivamente.

55 Más preferiblemente, la proteína de fusión según la invención es una en la que un miembro del grupo que consiste en L19 (largo), L19 (corto), F16 (largo), F16 (corto), F16 (A34M) (largo), F16 (A34M) (corto), G11 (largo) y G11 (corto) se fusiona con citocina IL-10, fragmentos funcionales y derivados funcionales de la misma.

Para todas las realizaciones y aspectos de la presente invención se prefiere que la citocina sea una murina o humana, preferiblemente una citocina humana, fragmento funcional o derivado funcional de la misma.

60 Las proteínas de fusión según la invención pueden disponerse de manera que la citocina, fragmento funcional o derivado funcional de la misma se fusiona de manera N-terminal o C-terminal con el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo.

65 Se encontró sorprendentemente que los derivados funcionales de ligador corto de L19, F16 y G11 dan como resultado una formación aumentada de diacuerpos en comparación con las variantes de ligador largo. Además, se observó sorprendentemente que las proteínas de fusión que comprenden scFv F16 (largo o corto) con una mutación



en la posición 34 en la secuencia de aminoácidos (A->M) [SEQ ID NO: 10 y 11] demostraban tasas de expresión mucho más altas en comparación con la secuencia de scFv F16 regular.

Debido a las ventajas anteriores de variantes cortas, se prefieren las proteínas de fusión según la invención en las que el anticuerpo fragmento o derivado funcional del mismo se selecciona del grupo que consiste en L19 (corto), F16 (corto), F16 (A34M) (corto) y G11 (corto).

Se prefieren más las proteínas de fusión que comprenden la variante F16 (A34M) (larga o corta) y las que comprenden la variante F16 (A34M) corta son las más preferidas.

De hecho, en un aspecto independiente la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende:

(i) F16 (A34M) (corto o largo, preferiblemente corto) que tiene afinidad de unión específica a al menos uno de los dominios extracelulares de tenascina oncofetal fusionado con cualquier citocina, fragmentos funcionales y derivados funcionales de la misma.

En una realización preferida la proteína de fusión es L19-IL-10.

En otra realización preferida las proteínas de fusión según la invención tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de una proteína de fusión según la invención para la fabricación de un medicamento.

En una realización preferida la presente invención se refiere al uso de las proteínas de fusión anteriores para el tratamiento de cáncer en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.

En otra realización preferida la presente invención se refiere al uso de las proteínas de fusión anteriores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, preferiblemente enfermedades inflamatorias crónicas en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.

Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, aterosclerosis, artritis, preferiblemente artritis reumatoide.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína de fusión de la invención y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden normalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión según la invención y opcionalmente sustancias auxiliares tales como excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). Dichas composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. Un portador o excipiente puede ser un material líquido que puede servir como vehículo o medio para el principio activo. Se conocen bien en la técnica portadores o excipientes adecuados e incluyen, por ejemplo, estabilizadores, antioxidantes, sustancias reguladoras del pH, excipientes de liberación controlada. La preparación farmacéutica de la invención puede adaptarse, por ejemplo, para uso parenteral y puede administrarse al paciente en forma de disoluciones o similares.

Al efectuar el tratamiento de un sujeto que padece enfermedades o estados descritos anteriormente, puede administrarse una proteína de fusión de la presente invención en cualquier forma o modo que haga que el compuesto terapéutico esté disponible en una cantidad eficaz, incluyendo vías oral o parenteral. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa y similares. Un experto en la técnica en el campo de la preparación de formulaciones puede seleccionar fácilmente la forma y el modo de administración apropiados dependiendo de las características particulares del producto seleccionado, la enfermedad o estado que va a tratarse, el estadio de la enfermedad o estado y otras circunstancias relevantes (véase por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (1990)).

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse solas o en forma de una preparación farmacéutica en combinación con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, cuya proporción y naturaleza se determinan mediante la solubilidad y propiedades químicas del producto seleccionado, la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica convencional. Los productos de la presente invención, aunque efectivos por sí mismos, pueden formularse y administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de adición de ácido o sales de adición de base, para fines de estabilidad, conveniencia de cristalización, solubilidad aumentada y similares.

#### Listas de secuencias

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de IL-10 humana; n.º de registro: P22301 (SwissProt); Vieira *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(4), 1172-1176 (1991).

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTTFFQMK  
 DQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLK  
 TLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIR  
**N**

5 SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de IL-15 humana; n.º de registro: P40933 (SwissProt); Grabstein *et al.*, Science 264 (5161), 965-968 (1994).

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHD  
 TVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

10 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de IL-24 humana; n.º de registro: Q13007 (SwissProt); Jiang *et al.*, Oncogene 11 (12), 2477-2486 (1995).

AQGQEFHFGPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAES  
 CYLVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDS  
 AHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFKYKL

15 SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de GM-CSF humano; n.º de registro: P04141 (SwissProt); Lee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 (13), 4360-4364 (1985).

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRL  
 ELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPF  
 DCWEPVQE

20 SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de GM-CSF murino; n.º de registro: P01587 (SwissProt); Miyatake *et al.*, EMBO J. 4 (10), 2561-2568 (1985).

APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTVCVQTRLKIFE  
 QGLRGNFTKLGALNMTASYQQTYCPPTPETDCETQVTTYADFDLSLKTFLTDIPFECKK  
 PVQK

25 SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de L19 (largo); Viti *et al.*, Cancer Res., 59(2): 347-52 (1999).

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT  
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTS  
**SGDGSSGGSGGASTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG**  
 QAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQG  
 TKVEIK

(Las letras en negrita indican el ligador de 14 aminoácidos)

30 SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de L19 (corto) (aún no publicado).

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT  
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTS  
**SGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYAS**  
 SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGGTKVEIK

(Las letras en negrita indican el ligador de 5 aminoácidos).

SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de F16 (largo).

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVS  
RGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ  
APVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVF  
GGTKLTVLG

SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de F16 (corto).

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVS  
10 **RGSSGG**SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKN  
NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVF  
GGTKLTVLG

(Las letras en negrita indican el ligador de 5 aminoácidos).

SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de F16 (A34M) (largo).

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVS  
RGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQ  
APVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVF  
GGTKLTVLG

(El aminoácido subrayado indica la sustitución de A a M).

20 SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de F16 (A34M) (corto).

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVS  
**RGSSGG**SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKN  
NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVF  
GGTKLTVLG

(El aminoácido subrayado indica la sustitución de A a M. Las letras en negrita indican el ligador de 5 aminoácidos).

25 SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de G11 (largo).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSRMGWVRQAPGKGLEWVSAINEEGG  
QYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPPHRPFDYWGQGTLV  
TVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRLYYASWYQQK  
PGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSHGPRRP  
VVF  
GGTKLTVLG

SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de G11 (corto).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSRMGWVRQAPGKGLEWVSAINEEGG  
QTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPHRPFDYWGQGTLV  
TVSRGSSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRLYYASWYQQKPGQAPVLIYG  
KNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSHGPRRPVVFGGGKLT  
V  
LG

5 SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión L19 (largo) - hull-10:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT  
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLVTVS  
SGDGSSGGSGGASTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG  
QAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQG  
TKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSSGSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTF  
QMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGE  
NLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM  
KIRN

10 SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión L19 (corto) - hull15:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT  
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLVTVS  
SGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYAS  
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSG  
SSSSGSSSSGNWVNVISDLKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVI  
SLESGDASIHTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI  
NTS

SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión hull15 - L19 (corto):

NWVNVISDLKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHD  
TVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSSSSGSS  
SGSSSSGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVS  
SISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWG  
QGTLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQA  
PRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTK  
VEIK

15

SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión hull24-L19 (corto):

AQGQEFHFGPCQVKGVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAES  
 CYLVHTLLEFYLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDS  
 AHRRFLLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFYKLSSSSSGSSSSSGSSSSSGEVQ  
 LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTY  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLTVSSGS  
 SGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA  
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión L19 (corto) huGM-CSF:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT  
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLTVS  
 SGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYAS  
 SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSG  
 SSSSGSSSSGAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETVEVISEMFD  
 LQEPTCLQTRLELYKQGLRGLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQIITFESFKE  
 5 NLKDFLLVIPFDCWEPVQE

SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión L19 (corto) - GM-CSF murino:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT  
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLTVS  
 SGSSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYAS  
 SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSG  
 SSSSGSSSSGAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLT  
 CVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDCETQVTTYAD FIDSLKTF  
 10 LTDIPFECKKPVQK

**Figuras**

La figura 1 ilustra la acumulación de las proteínas de fusión en tumores F9 subcutáneos en ratones 129Sv. Los  
 15 datos de biodistribución demuestran que las cuatro proteínas de fusión tienen una captación superior en el tumor en  
 comparación con órganos normales. Se muestran datos a las 24 h tras la inyección de las proteínas radiomarcadas  
 para: A) L19-IL10, B) IL15-L19, C) IL24-L19, D) L19-GMCSF y E) L19-IL15.

Figura 2. Obtención de imágenes de infrarrojo cercano mediada por anticuerpos de ratones artríticos. Se les inyectó  
 20 a los animales SIP(L19)-Alexa750 (a), SIP(G11)-Alexa750 (b) o SIP-Alexa750 de control (c). Se tomaron fotografías  
 24 h tras la inyección de los anticuerpos marcados fluorescentemente. Las flechas indican hinchazón de grado 2 en  
 las patas delanteras de los ratones.

Figura 3. Acumulación de SIP(L19) y SIP(G11) radiomarcado en patas artríticas. El panel A muestra las  
 25 extremidades artríticas de un ratón al que se le inyectó SIP(L19)<sup>-125I</sup>. La pata izquierda se clasificó como artritis de  
 grado 2, la pata derecha como de grado 1. El panel B presenta el mismo experimento con SIP(G11)<sup>-125I</sup>. En este  
 caso la pata izquierda se clasificó como artritis de grado 1, la pata derecha como de grado 2. El panel C muestra un  
 ratón al que se le inyectó SIP<sup>-125I</sup> de control, un anticuerpo que no se une a ninguna estructura en el ratón. En este  
 caso la pata izquierda se clasificó como artritis de grado 2, la pata derecha como de grado 1.

La figura 4 ilustra el direccionamiento de citocinas a lesiones artríticas. Se les inyectó a ratones artríticos por vía

intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola solución salina (círculos negros), L19-IL2 (triángulos negros, línea discontinua), L19-TNFalfa (cruces, línea discontinua) o L19-IL10 (cuadrados blancos) diluido en un volumen de 200 µl de solución salina. Se iniciaron las inyecciones en el día 1 tras la aparición de la artritis y se repitieron luego cada dos días durante 3 inyecciones por animal tal como se indica mediante las flechas. Las dosis acumulativas para las proteínas de fusión fueron: 20 µg de equivalentes de IL2, 6 µg de equivalentes de TNFalfa y 150 µg de equivalentes de IL 10 por ratón, respectivamente. Se evaluó la puntuación artrítica diariamente y se expresó como medias ± EEM. Se midió la hinchazón de las patas cada dos días y se asignó la media de las 4 patas como grosor de la pata a cada animal. Los resultados presentados son medias ± EEM de cada grupo. Cada grupo consistía en 7 ratones.

La figura 5 demuestra que la administración dirigida de IL10 a sitios de inflamación es superior al tratamiento con IL10 sistémico. Se les inyectó a ratones artríticos por vía intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola solución salina (círculos negros), L19-IL10 (cuadrados blancos) o HyHel10-IL10 (cruces, línea discontinua) diluido en un volumen de 200 µl de solución salina. Se iniciaron las inyecciones en el día 1 de aparición de la artritis y luego se repitieron cada dos días durante 3 inyecciones por animal tal como se indica mediante las flechas. Las dosis acumulativas para las proteínas de fusión fueron 150 µg de equivalentes de IL10 por ratón. Se evaluó la puntuación artrítica diariamente y se expresó como medias ± EEM. Se midió la hinchazón de las patas cada dos días y se asignó la media de las 4 patas como grosor de la pata a cada animal. Los resultados presentados son medias ± EEM de cada grupo. Cada grupo contenía 6 ratones.

La figura 6 ilustra la terapia de tumores F9 s.c. con diferentes cantidades de L19-GM-CSF. Inyecciones i.v. diarias durante cuatro días consecutivos (flechas) con 60 µg de L19-GM-CSF demostraron un retardo del crecimiento tumoral significativo en comparación con el grupo tratado con solución salina (PBS).

La figura 7 ilustra la terapia de tumores F9 s.c. con L19-IL15. Inyecciones i.v. diarias durante cuatro días consecutivos (flechas) con 50 µg de L19-IL15 demostraron un retardo del crecimiento tumoral significativo en comparación con el grupo de control (PBS).

La figura 8 ilustra the terapia de tumores F9 s.c. con IL24-L19. Inyecciones i.v. diarias durante cuatro días consecutivos (flechas) con 50 µg de IL24-L19 mostraron un retardo del crecimiento tumoral significativo en comparación con el grupo de control (PBS).

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Preparación de proteínas de fusión

Se fusionaron genéticamente las citocinas al extremo o bien C- o bien N-terminal de los fragmentos de anticuerpos scFv separados por un ligador de 15 aminoácidos. Se clonaron los fragmentos resultantes, precedidos por una secuencia de secreción requerida para la secreción de proteínas recombinantes, en un vector de expresión de mamíferos y se expresaron las proteínas de fusión en células HEK 293 transfectadas de manera estable. Se purificaron los constructos del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad en columnas de antígenos a rendimientos de 1-2 mg / l. Se realizó el control de calidad mediante SDS-PAGE y filtración en gel.

### Ejemplo 2 - Formulación y administración de proteínas de fusión

Las proteínas de fusión se solubilizan en disoluciones fisiológicas y se administran por vía intravenosa a animales. Se almacenan las proteínas en uno de los siguientes tampones dependiendo de su punto isoeléctrico y el tiempo de almacenamiento deseado. Las proteínas se mantienen durante un almacenamiento de tiempo largo (más de un mes) a menos 80°C. Para evitar la agregación por ciclos de congelación y descongelación repetidos, pueden añadirse glicerol al 1% y Tween 80 al 0,04%.

PBS (solución salina tamponada con fosfato): NaCl 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM x 2 H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM x 2 H<sub>2</sub>O, pH 7,4

K-PBS: NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM x 2 H<sub>2</sub>O, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4

PBS Siena: NaCl 20 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,7 mM x 2 H<sub>2</sub>O, KCl 1,8 mM, manitol 133 mM, pH 6,3

TBS (solución salina tamponada con Tris): Tris 20 mM, NaCl 130 mM, pH 8,2

Se administran normalmente las inyecciones 3-5 veces, diariamente o cada dos días. La dosificación se selecciona según valores de la bibliografía siguiendo experimentación de rutina.

### Ejemplo 3 - Eficacia de direccionamiento de la proteína de fusión en ratones 129Sv injertados con tumores F9 subcutáneos

Se evaluaron las propiedades de direccionamiento *in vivo* de una preparación radioyodada de L19-IL10 en un experimento de biodistribución en ratones 129SvEv que portan teratocarcinomas F9 subcutáneos. Se observaron razones de tumor/órgano favorables (que oscilan entre 7:1 y 128:1) 24 horas tras la administración intravenosa. Se evaluaron las propiedades de direccionamiento *in vivo* de preparaciones radioyodadas de L19-IL15, IL15-L19, IL24-L19 y L19-GM-CSF en un experimento de biodistribución en ratones 129SvEv que portan teratocarcinomas F9 subcutáneos. Se observaron razones de tumor:órgano favorables 24 horas tras la administración intravenosa.

#### Ejemplo 4 - Los anticuerpos monoclonales humanos L19 y G11 se acumulan selectivamente en sitios de artritis

Se estudió el rendimiento de direccionamiento *in vivo* de L19 y G11 en formato de mini-anticuerpo (Borsi *et al.*, Int. J. Cancer, 102(1): 79-85 (2002)) en ratones artríticos usando tanto fluorescencia como radioactividad para la detección de anticuerpos.

Se les inyectó a ratones artríticos SIP(L19), SIP(G11) o SIP de control marcado con el colorante de infrarrojo cercano Alexa 750. Veinticuatro horas tras la inyección intravenosa se obtuvieron imágenes de los animales usando un instrumento de obtención de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo, revelando una acumulación de anticuerpos fuerte y selectiva en las lesiones presentes en la extremidad artrítica en el caso de SIP(L19) y SIP(G11) [Figura 2]. En cambio, los ratones a los que se les inyectó SIP de control, un anticuerpo de especificidad irrelevante en el ratón que se usó como control negativo, presentaban sólo una débil señal de fluorescencia, debido a la extravasación no específica del anticuerpo marcado a través de vasos con fugas en la extremidad inflamada.

Se les inyectó a ratones artríticos SIP(L19) y SIP(G11) marcados radiactivamente. Tras 24 h, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron imágenes de las patas mediante autorradiografía. Se observó una acumulación preferente de radioactividad en las extremidades inflamadas de ratones a los que se les inyectó SIP(L19) y SIP(G11), mientras que no pudo detectarse acumulación de anticuerpos preferente en ratones que presentaban grados comparables de inflamación a los que se les había inyectado anticuerpo SIP de especificidad irrelevante en el ratón [figura 3].

#### Ejemplo 5 - Eficacia terapéutica de la proteína de fusión L19-IL10 en el modelo de artritis de ratón inducida por colágeno

El modelo animal mejor conocido y más ampliamente usado para la artritis reumatoide es la artritis inducida por colágeno de tipo II (CIA) en o bien ratón o bien rata [Bliven *et al.*, Arthritis Rheum. 29(9): 1131-8 ((1986)]. Se ha notificado que este modelo tiene varias características en común con la artritis reumatoide (AR) en seres humanos, incluyendo respuestas inmunológicas humorales y celulares al colágeno, unión a genes que residen en el locus de histocompatibilidad mayor y algunas manifestaciones histológicas similares. Maini y Feldmann han realizado la mayor parte de su trabajo pionero, tal como la investigación de anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral como estrategia terapéutica para ARN, usando este modelo animal [Williams *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(20): 9784-8 (1992); Williams *et al.*, J. Immunol. 165(12): 7240-5 (2000)].

##### *Efecto de la administración dirigida de citocinas a lesiones artríticas:*

En un primer experimento, se comparó el potencial terapéutico de L19-IL10 con el de L19-IL2 y L19-TNF usando ratones con CIA. Se usaron ratones a los que se les inyectó solución salina como grupo de control. Los ratones recibieron tres inyecciones cada 48 h comenzando en el día 1 tras la aparición de la artritis. Las dosis acumulativas, que eran iguales a las usadas anteriormente para experimentos de terapia frente a tumores, fueron de 60 µg de L19-IL2 y 15 µg de L19-TNF. Se usaron 450 µg de L19-IL10 por ratón en este experimento y en experimentos posteriores con proteínas de fusión de anticuerpo-IL10, en línea con las dosis de IL10 que se encontró anteriormente que eran activas y no tóxicas en ratones.

L19-IL10 tenía un claro efecto terapéutico sobre la puntuación artrítica y sobre la hinchazón de las patas (véase la figura 4). La magnitud de este efecto era comparable al observado para anticuerpos neutralizantes de TNF en el mismo modelo animal. En cambio, L19-IL2 y L19-TNF condujeron a una hinchazón rápida y pronunciada de las extremidades afectadas, que era más grave que en el grupo de control de solución salina. Ninguno de los animales tratados murió o presentó una pérdida de peso de más del 15% y los parámetros artríticos no empeoraron significativamente tras la tercera administración de anticuerpo (figura 4).

##### *Comparación de la administración dirigida en comparación con la aplicación sistémica de IL10:*

Con el fin de demostrar una ventaja terapéutica de una versión dirigida de IL10, en comparación con la citocina no dirigida, se investigaron las dos proteínas de fusión L19-IL10 y HyHel10-IL10 en el modelo de artritis de CIA. Como en el experimento anterior, se trataron grupos de 6 ratones artríticos con tres inyecciones de L19-IL10, HyHel10-IL10 o solución salina cada dos días comenzando en el primer día de aparición de la artritis. Para ambas proteínas de fusión, la dosis acumulativa administrada a cada ratón fue de 450 µg. Tal como se esperaba, L19-IL10 demostró una respuesta terapéutica significativa en comparación con el grupo de control de solución salina, permaneciendo baja la puntuación artrítica y la hinchazón de la pata hasta el día 9 tras la aparición de la artritis (es decir, 4 días tras la

última inyección). Consecuente con observaciones previas de una actividad terapéutica de IL10 en este modelo, la proteína de fusión HyHEL10-IL10 no dirigida presentaba un beneficio terapéutico en comparación con el control de solución salina, que, sin embargo, no era tan eficiente como en el caso de L19-IL10 (figura 5).

5 Ejemplo 6 - Eficacia terapéutica de las proteínas de fusión L19-IL15, IL24-L19 y L19-GM-CSF en ratones 129Sv injertados con tumores F9 subcutáneos.

10 En un primer experimento, se evaluó el potencial terapéutico de L19-GM-CSF, L19-IL15 e IL24-L19 usando ratones con tumores F9 s.c. Se usaron ratones a los que se les inyectó solución salina como grupo de control. Los ratones recibieron un total de cuatro inyecciones cada 24 h comenzando en el día 4 tras la implantación de células tumorales cuando los tumores eran ya visibles y medibles. Las dosis acumulativas, que eran iguales a las usadas anteriormente para experimentos de terapia frente a tumores, fueron de 240 µg para L19-GM-CSF, 200 µg para L19-IL15 y 200 µg para IL24-L19. Las tres proteínas de fusión no eran tóxicas en este entorno y demostraron un retardo del crecimiento tumoral significativo en comparación con el grupo control (figuras 6-8).

15 **Lista de secuencias**

- <110> Philogen S.p.A.
- 20 <120> Citocinas dirigidas por anticuerpos para terapia
- <130> RP50020PCT
- <160> 19
- 25 <170> Patent In versión 3.3
- <210> 1
- <211> 178
- 30 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1



ES 2 606 490 T3

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val  
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His  
 20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe  
 35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu  
 50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro  
 85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu  
 100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg  
 115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn  
 130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu  
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile  
 165 170 175

Arg Asn

5 <210> 2  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 606 490 T3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
 1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
 20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
 35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
 50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
 65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile  
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
 100 105 110

Thr Ser

<210> 3  
 <211> 158  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly Val  
 1 5 10 15

Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr Met  
 20 25 30

Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu Val  
 35 40 45

10

Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr Leu

ES 2 606 490 T3

50

55

60

Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg Thr  
65 70 75 80

Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn Phe  
85 90 95

Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met Phe  
100 105 110

Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg Ala  
115 120 125

Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly Glu  
130 135 140

Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu  
145 150 155

<210> 4

<211> 127

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val  
1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr  
20 25 30

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp  
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln  
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met  
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys  
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp  
100 105 110

10

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

ES 2 606 490 T3

115

120

125

<210> 5  
 <211> 124  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 5

Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His Val  
 1 5 10 15

Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp Met Pro Val Thr  
 20 25 30

Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe Ser Phe Lys Lys  
 35 40 45

Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu Gln Gly Leu Arg  
 50 55 60

Gly Asn Phe Thr Lys Leu Lys Gly Ala Leu Asn Met Thr Ala Ser Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp Cys Glu Thr Gln  
 85 90 95

Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys Thr Phe Leu Thr  
 100 105 110

10 Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln Lys  
 115 120

<210> 6  
 <211> 238  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> L19 (largo)

20 <400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

ES 2 606 490 T3

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser  
115 120 125

Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser  
130 135 140

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser  
145 150 155 160

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
165 170 175

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg  
180 185 190

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg  
195 200 205

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg  
210 215 220

Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
225 230 235

<210> 7  
<211> 229  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> L19 (corto)

10 <400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

ES 2 606 490 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 115 120 125

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg  
 165 170 175

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
 195 200 205

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys  
 225

<210> 8  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> F16 (largo)

5

10

ES 2 606 490 T3

<400> 8

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

Gly Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu  
130 135 140

Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val  
165 170 175

Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
180 185 190

Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln  
195 200 205

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met  
210 215 220

Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
225 230 235

5 <210> 9

ES 2 606 490 T3

<211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> F16 (corto)

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

Gly Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp  
 115 120 125

Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln  
 130 135 140

Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 145 150 155 160

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser  
 165 170 175

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
 180 185 190

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 195 200 205

Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr

10



ES 2 606 490 T3

210

215

220

Lys Leu Thr Val Leu Gly  
225 230

<210> 10  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> F16(A34M) (largo)

10

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu  
130 135 140

Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr  
145 150 155 160

Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val  
165 170 175

Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
180 185 190

ES 2 606 490 T3

Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln  
 195 200 205

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met  
 210 215 220

Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230 235

<210> 11  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> F16(A34M) (corto)

10

<400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp  
 115 120 125

Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln  
 130 135 140

Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 145 150 155 160

ES 2 606 490 T3

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser  
 165 170 175

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
 180 185 190

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 195 200 205

Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 210 215 220

Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230

<210> 12  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> G11 (largo)

10

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Glu Glu Gly Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys His Pro Pro His Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

ES 2 606 490 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val  
 130 135 140

Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg  
 145 150 155 160

Leu Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val  
 165 170 175

Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg  
 180 185 190

Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly  
 195 200 205

Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser His Gly  
 210 215 220

Pro Arg Arg Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 225 230 235 240

Gly

<210> 13  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> G11 (corto)

10

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30

Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Glu Glu Gly Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 606 490 T3

85 90 95

Ala Lys His Pro Pro His Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr  
 115 120 125

Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr  
 130 135 140

Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Leu Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln  
 145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg  
 165 170 175

Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr  
 180 185 190

Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Tyr Cys Asn Ser Ser His Gly Pro Arg Arg Pro Val Val Phe Gly Gly  
 210 215 220

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230

<210> 14  
 <211> 413  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Proteína de fusión L19 (largo) - hull-10

10 <400> 14

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

ES 2 606 490 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
  
 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser  
 115 120 125  
  
 Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser  
 130 135 140  
  
 Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser  
 145 150 155 160  
  
 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
 165 170 175  
  
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg  
 180 185 190  
  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg  
 195 200 205  
  
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg  
 210 215 220  
  
 Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser  
 225 230 235 240  
  
 Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Gly  
 245 250 255  
  
 Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu  
 260 265 270  
  
 Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr  
 275 280 285  
  
 Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser  
 290 295 300  
  
 Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu

ES 2 606 490 T3

305					310						315				320
Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln
				325					330					335	
Asp	Pro	Asp	Ile	Lys	Ala	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys
			340					345					350		
Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu
		355					360					365			
Asn	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu
	370					375					380				
Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile
385					390					395					400
Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Arg	Asn			
				405					410						

<210> 15  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Proteína de fusión L19 (corto) - hUL15

10

<400> 15

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

ES 2 606 490 T3

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 115 120 125

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg  
 165 170 175

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
 195 200 205

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser  
 225 230 235 240

Ser Ser Ser Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile  
 245 250 255

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
 260 265 270

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
 275 280 285

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
 290 295 300

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser  
 305 310 315 320

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
 325 330 335

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
 340 345 350

Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 355



ES 2 606 490 T3

<210> 16  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial

<220>  
 <223> Proteína de fusión hUL15 - L19 (corto)

10 <400> 16

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
 1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
 20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
 35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
 50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
 65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile  
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
 100 105 110

Thr Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser  
 115 120 125

Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 130 135 140

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser  
 145 150 155 160

Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175

Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 180 185 190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu  
 195 200 205

ES 2 606 490 T3

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 210 215 220

Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln  
 245 250 255

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 260 265 270

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln  
 275 280 285

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser  
 290 295 300

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 305 310 315 320

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val  
 325 330 335

Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly  
 340 345 350

Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 355

<210> 17  
 <211> 402  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Proteína de fusión hull24 - L19 (corto)

10 <400> 17

Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly Val  
 1 5 10 15

Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr Met  
 20 25 30

Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu Val  
 35 40 45

ES 2 606 490 T3

Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr Leu  
 50 55 60

Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg Thr  
 65 70 75 80

Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn Phe  
 85 90 95

Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met Phe  
 100 105 110

Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg Ala  
 115 120 125

Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly Glu  
 130 135 140

Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu Ser Ser  
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Glu Val Gln  
 165 170 175

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
 180 185 190

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met Ser  
 195 200 205

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile  
 210 215 220

Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg  
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met  
 245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro  
 260 265 270

Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 275 280 285

Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr  
 290 295 300

ES 2 606 490 T3

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser  
305 310 315 320

Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
325 330 335

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly  
340 345 350

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
355 360 365

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln  
370 375 380

Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
385 390 395 400

Ile Lys

<210> 18  
<211> 371  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Proteína de fusión L19 (corto) - huGM-CSF

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

ES 2 606 490 T3

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 115 120 125

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg  
 165 170 175

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
 195 200 205

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser  
 225 230 235 240

Ser Ser Ser Gly Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro  
 245 250 255

Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu  
 260 265 270

Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser  
 275 280 285

Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu  
 290 295 300

Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro  
 305 310 315 320

Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro  
 325 330 335

Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu  
 340 345 350

ES 2 606 490 T3

Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro  
 355 360 365

Val Gln Glu  
 370

5 <210> 19  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Proteína de fusión L19 (corto) - GM-CSF murino

<400> 19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 115 120 125

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 130 135 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg  
 165 170 175

ES 2 606 490 T3

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
 195 200 205

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser  
 225 230 235 240

Ser Ser Ser Gly Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro  
 245 250 255

Trp Lys His Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp  
 260 265 270

Met Pro Val Thr Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe  
 275 280 285

Ser Phe Lys Lys Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu  
 290 295 300

Gln Gly Leu Arg Gly Asn Phe Thr Lys Leu Lys Gly Ala Leu Asn Met  
 305 310 315 320

Thr Ala Ser Tyr Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp  
 325 330 335

Cys Glu Thr Gln Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys  
 340 345 350

Thr Phe Leu Thr Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Val Gln Lys  
 355 360 365

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína de fusión que comprende:
  - 5 (i) un anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo que tiene afinidad de unión específica o bien al dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B) o bien a al menos uno de los dominios extracelulares de tenascina oncofetal fusionado a
  - 10 (ii) citocina IL-10, o fragmentos funcionales de la misma.
2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos injertados con CDR, fragmentos Fv, fragmentos Fab, fragmentos Fab<sub>2</sub> y proteínas de unión similares a anticuerpos.
3. Proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2, en la que el derivado funcional del anticuerpo es el diacuerpo L19 (largo) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6.
4. Proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2, en la que el derivado funcional del anticuerpo es el diacuerpo L19 (corto) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7.
5. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que un miembro del grupo que consiste en L19 (largo), L19 (corto), F16 (largo), F16 (corto), F16 (A34M) (largo), F16 (A34M) (corto), G11 (largo) y G11 (corto) que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 6 a 13, respectivamente, se fusiona con citocina IL-10, o fragmentos funcionales de la misma.
6. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la citocina es una citocina murina o humana, preferiblemente una citocina humana, o fragmento funcional de la misma.
- 30 7. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la citocina, o fragmento funcional de la misma se fusiona de manera N-terminal o C-terminal, preferiblemente N-terminal, con el anticuerpo, fragmento funcional o derivado funcional del mismo.
- 35 8. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el fragmento de anticuerpo o derivado funcional del mismo se selecciona del grupo que consiste en L19 (corto), F16 (corto), F16 (A34M) (corto) y G11 tal como se exponen en SEQ ID NO: 7, 9, 11 y 13, respectivamente, preferiblemente F16 (A34M) (corto).
- 40 9. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la proteína de fusión es L19-IL-10.
10. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14.
- 45 11. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en terapia.
12. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.
- 50 13. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, preferiblemente enfermedades inflamatorias crónicas en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.
- 55 14. Proteína de fusión para su uso según la reivindicación 13, en la que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, aterosclerosis, artritis, preferiblemente artritis reumatoide.
15. Composición farmacéutica que comprende al menos una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.



Fig. 1

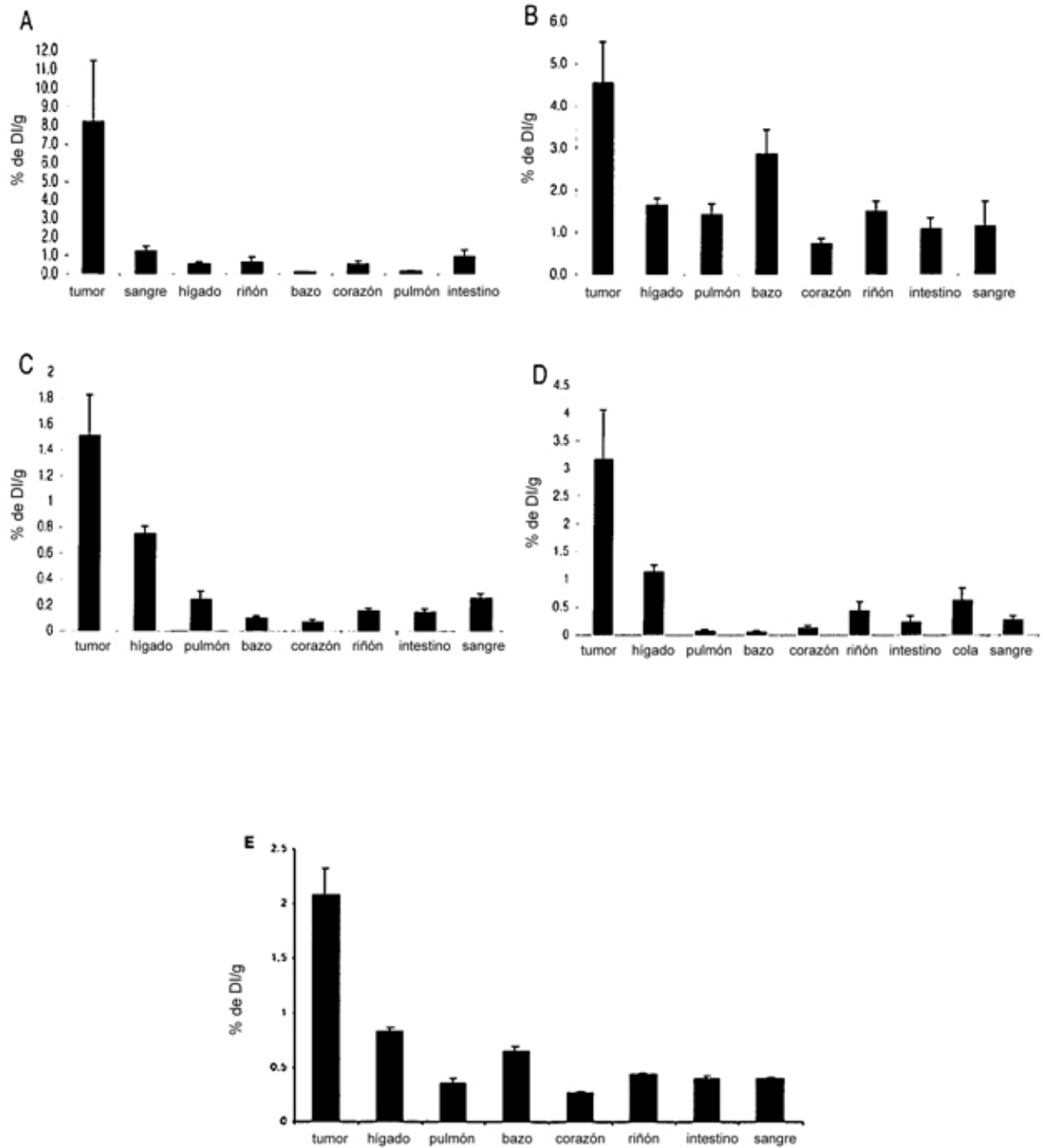


Fig. 2

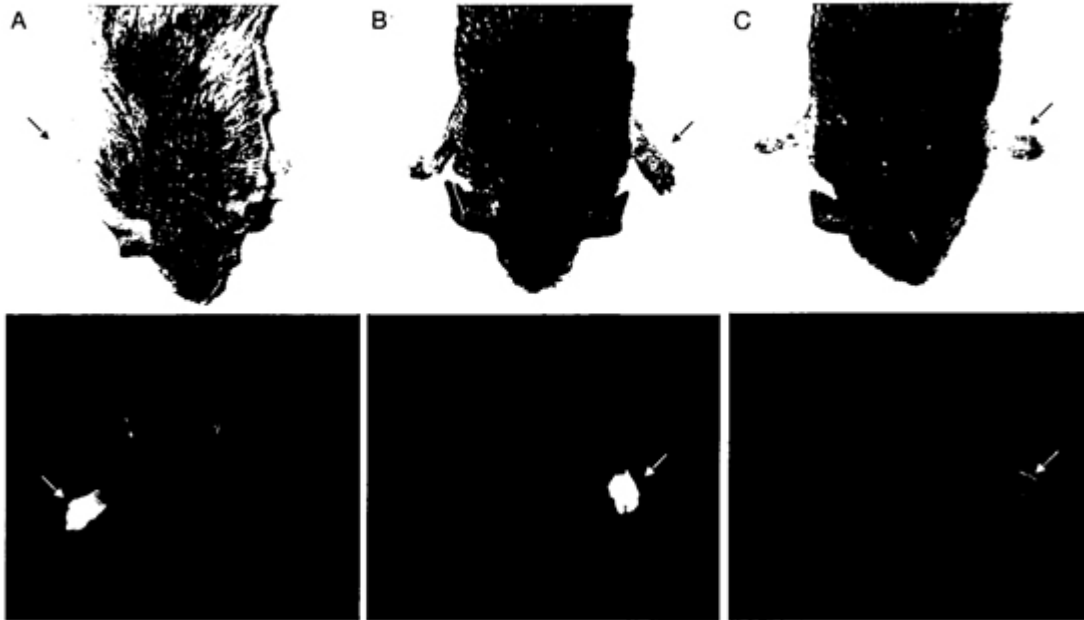


Fig. 3

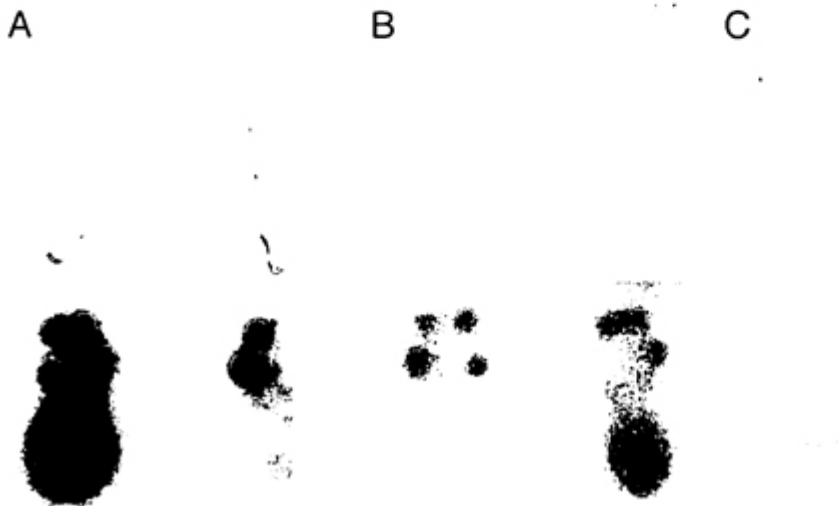


Fig. 4

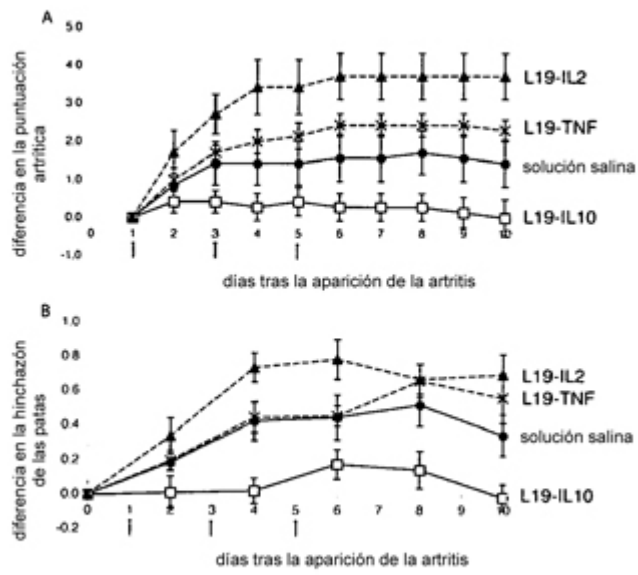


Fig. 5

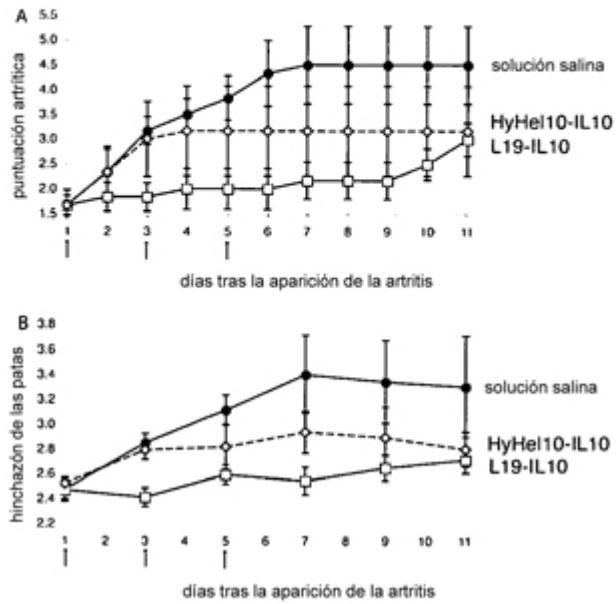


Fig. 6

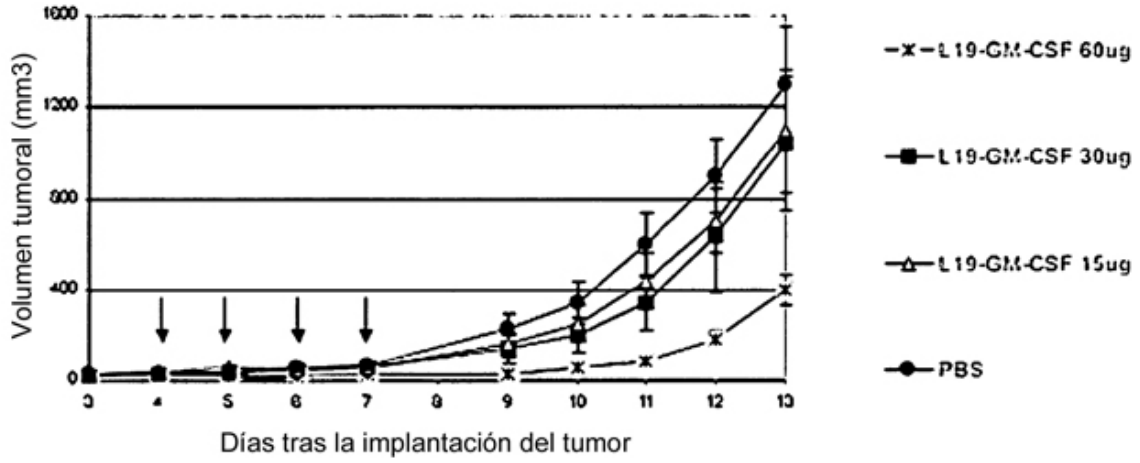


Fig. 7

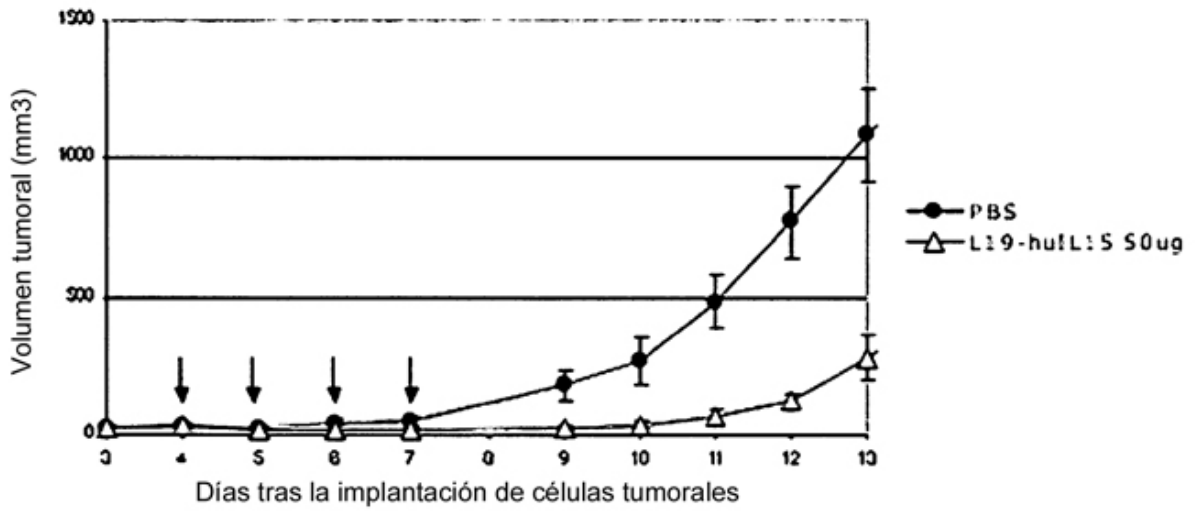


Fig.8

