

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 060**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/545 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/EP2014/064227**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007536**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14734831 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3022305**

54 Título: **Fusoquinas que implican citoquinas con afinidades de unión por el receptor fuertemente reducidas**

30 Prioridad:

18.07.2013 EP 13306034

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2018

73 Titular/es:

VIB VZW (20.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE;
UNIVERSITEIT GENT (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (20.0%);
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2 (20.0%) y
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (20.0%)

72 Inventor/es:

TAVERNIER, JAN;
BULTINCK, JENNYFER;
GERLO, SARAH;
UZÉ, GILLES;
PAUL, FRANCIANE y
BORDAT, YANN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 657 060 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

Fusoquinas que implican citoquinas con afinidades de unión por el receptor fuertemente reducidas

5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende CCL20 e IL-1 β , de las que al menos una es una citoquina modificada con una afinidad de unión a su receptor, o a uno de sus receptores, fuertemente reducida. Preferentemente, ambas citoquinas están conectadas mediante un enlazador, preferentemente un enlazador GGS. La invención se refiere adicionalmente a dicha proteína de fusión para su uso en el tratamiento de enfermedades.

10 Las citoquinas son proteínas pequeñas secretadas o unidas a la membrana que tienen un papel fundamental en la comunicación intercelular. La unión de la citoquina a su complejo receptor análogo desencadena una cascada de eventos de señalización intracelular que permite a la célula detectar y responder a su entorno según las necesidades de la célula, tejido y órgano del que forma parte. Son característicamente pleiotrópicas, lo que significa que provocan una amplia gama de respuestas dependiendo de la naturaleza y del desarrollo de la célula diana. Además, algunas de ellas son muy redundantes, ya que varias citoquinas tienen actividades que se solapan, lo que las permite compensar funcionalmente pérdidas mutuas. Las actividades citoquina pueden ser autocrinas, paracrinas o endocrinas, ocasionando un límite poco claro entre los términos designados citoquina, hormona peptídica y factor de crecimiento.

20 Se conocen seis clases estructurales diferentes de citoquinas: las citoquinas de haz α -helicoidal, que comprenden la mayoría de interleuquinas, factores estimulantes de colonias y hormonas tales como la hormona del crecimiento y la leptina (Nicola y Hilton, 1998), la familia del factor de necrosis tumoral trimérico (TNF) (Idriss y Naismith, 2000), los factores de crecimiento del nudo de cisteína (Sun y Davies, 1995), el grupo del pliegue β -trébol que incluye la familia de la interleuquina-1 (Murzin et al., 1992), la familia de la interleuquina 17 (IL-17) (Gaffen, 2011), y las quimioquinas (Nomiyama et al., 2013).

30 Se ha descubierto que varias citoquinas tienen importantes aplicaciones clínicas. Los ejemplos incluyen eritropoyetina (Epo), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), interferones α 2 y β , y hormona del crecimiento. Por el contrario, frecuentemente como consecuencia de su naturaleza proinflamatoria, las citoquinas antagonistas seleccionadas también tienen aplicaciones médicas específicas. Aquí, los ejemplos principales son las estrategias para bloquear la actividad TNF α para combatir las enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide. Debido a estos éxitos, se están explorando estrategias para optimizar actividades citoquinas en el escenario clínico. Estas incluyen una semivida optimizada, inmunogenicidad reducida, administración dirigida a tipos celulares específicos y fusiones genéticas de dos citoquinas, las denominadas fusoquinas.

40 Las fusoquinas son combinaciones artificiales de dos citoquinas diferentes que están genéticamente vinculadas usando una secuencia enlazadora. El primer ejemplo de una fusoquina es pIXY321 o pixiquina, que es una proteína de fusión de un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-3 (Donahue et al., 1988) que mostró superiores efectos hematopoyéticos e inmunitarios en comparación con cualquier citoquina sola. Este efecto se podría explicar por una mejora en la unión a sus respectivos complejos receptores. Cabe destacar que, ambos receptores comparten la subunidad de señalización β c, imposibilitando efectos sinérgicos en el nivel de transducción de la señal. En un ensayo clínico en Fase III, pIXY321 no mostró propiedades superiores cuando se comparó con GM-CSF en solitario (O'Shaughnessy et al., 1996). Se han estudiado también las fusoquinas basadas de GM-CSF con las citoquinas de la familia IL-2. Todas estas citoquinas señalizan a través de complejos del receptor que comprenden la subunidad γ c. Los ejemplos de estas fusoquinas con GM-CSF incluyen IL-2 (Stagg et al., 2004), IL-15 (Rafei et al., 2007) y IL-21 (Williams et al., 2010a), así como GIFT2, 15 y 21. Se podrían esperar efectos sinérgicos tanto a nivel de la señalización (es decir, efectos sinérgicos dentro de una célula diana) y a nivel celular (es decir, efectos sinérgicos entre diferentes tipos de células diana). Por ejemplo, GIFT2 indujo una activación más potente de linfocitos NK en comparación con la combinación de citoquinas no fusionadas (Penafuerte et al., 2009) y GIFT15 indujo, de forma no prevista, una potente población inmunosupresora de linfocitos B (Rafei et al., 2009a). Igualmente, GIFT21 ejerció efectos proinflamatorios inesperados en células monocíticas (Williams et al., 2010b). Otro ejemplo de una fusoquina que combina citoquinas α -helicoidales es IL-2/IL-12 (Gillies et al., 2002; Jahn et al., 2012).

55 Otra clase de fusoquinas combina citoquinas de diferentes familias estructurales. Los ejemplos incluyen la fusión de IL-18 (un miembro de la familia de la citoquina IL-1) e IL-2 (Acras et al., 2005) y la fusión entre IL-18 y EGF (factor de crecimiento epidérmico). Puesto que la expresión en exceso del EGFR se observa frecuentemente en determinados tipos de células tumorales, la última fusoquina ofrece la posibilidad de dirigir la actividad de IL-18 a las células tumorales EGFR+ (Lu et al., 2008). Las fusiones entre las citoquinas del haz α -helicoidal y las quimioquinas también se ha estudiado con mayor detalle. Las quimioquinas actúan frecuentemente usando gradientes de concentración para dirigir la migración de las células inmunitarias a los sitios de infección e inflamación. Muchos receptores de quimioquinas presentan un patrón de expresión restringido que permite el direccionamiento a células (inmunitarias) seleccionadas. Además, la señalización mediante la serpienteina, los receptores de quimioquinas acoplados a la proteína G son fundamentalmente diferentes de las rutas activadas por los complejos del receptor de citoquinas del haz α -helicoidal, y se podrían esperar mecanismos de relación cruzada positivos y negativos. Cabe destacar que, las

versiones truncadas en el extremo N diseñadas de las quimioquinas pueden retener sus propiedades de unión al receptor, pero presentan un comportamiento antagonista. Un ejemplo es una fusioquina entre GM-CSF y un CCL2 truncado en el extremo N que carece de los 5 primeros aminoácidos del extremo N, es decir GMME1 (Rafei et al., 2009b). Esta fusioquina indujo la apoptosis de células inflamatorias CCR2+ y los ratones tratados con GMME1 mostraron puntuaciones reducidas en enfermedades autoinmunitarias inducidas experimentalmente incluyendo EAE y CIA para esclerosis múltiple (Rafei et al., 2009b) y artritis reumatoide (Rafei et al., 2009c), respectivamente. Igualmente, esta fusioquina indujo la apoptosis de células tumorales CCR2+ (Rafei et al., 2011).

Sin embargo, las fusiones entre una citoquina natural y una citoquina mutante con una afinidad fuertemente reducida por su complejo receptor análogo no se habían estudiado hasta la fecha. La ventaja de este enfoque es que se elimina la posible toxicidad sistémica de la citoquina natural.

El documento WO 2008/124086 divulga fusioquinas para el tratamiento de determinadas enfermedades, *inter alia* que comprenden una citoquina TNF α 2a mutada.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que estas fusioquinas permiten el direccionamiento específico de la célula de las actividades de la citoquina, de forma que dicha citoquina mutante puede recuperar su actividad en las células diana, sin el efecto negativo de las citoquinas naturales. La aplicabilidad general del principio se ha demostrado usando tres fusioquinas, cada una de ellas compuesta por dos citoquinas procedentes de dos clases de citoquinas estructuralmente diferentes, como se ilustra a continuación.

XCL1 / IFN α 2 mutante

XCL1 es una quimioquina de 93 aminoácidos, secretada por linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ polarizados en linfocitos Th1, y por linfocitos NK. Interactúa con XCR1, un receptor de quimioquinas expresado exclusivamente en células dendríticas. En ratones, XCR1 se expresa en la gran mayoría de células dendríticas esplénicas CD11c⁺ CD8 α ⁺ mientras que solamente un subgrupo muy pequeño de células dendríticas CD8 α ⁻ expresan este receptor (Dorner et al. 2009). XCR1 es un marcador selectivo conservado de células de mamíferos (incluidas las células humanas) homólogas a las células dendríticas CD8 α ⁺ de ratón (Croizat et al. 2010). De manera interesante, se ha demostrado que la acción del interferón de tipo I (IFN α / β) sobre este subgrupo de células dendríticas es fundamental para el reconocimiento inmunitario innato de un tumor en crecimiento en ratones (Fuertes et al. 2011).

La terapia sistémica con IFN α tiene una toxicidad notable, incluidos efectos secundarios tales como fatiga grave, fiebre, escalofríos, depresión, disfunción tiroidea, enfermedad retinal, pérdida de cabello, sequedad de la piel, erupción, picor y supresión de médula ósea. Por tanto, sería muy valioso dirigir la actividad de IFN hacia solamente la población celular que deba tratarse con IFN. Para la aplicación de terapias antitumorales, el direccionamiento de la población de células dendríticas que expresa XCR1 es muy deseable porque estas células están especializadas en la presentación cruzada de antígenos (Bachem et al. 2012). Muchos datos experimentales sugieren que la población de células dendríticas que expresan XCR1 representa la población celular clave que debe reaccionar con el IFN de tipo I. en el microambiente tumoral para iniciar las respuestas inmunitarias que, en última instancia, permitirán la destrucción del tumor y la inmunización (Gajewski et al. 2012).

El mutante IFN α 2-Q124R humano tiene una elevada afinidad por la cadena IFNAR1 de murino y baja afinidad por la cadena IFNAR2 de murino (Weber et al., 1987). Presenta una actividad muy baja en células de murinos y, por tanto, representa un prototipo de un subtipo de IFN tipo I diseñado mediante ingeniería genética para dirigir la actividad IFN en células de ratón seleccionadas (PCT/EP2013/050787).

CCL20 / IL1 β

La quimioquina CC CCL20, también conocida como quimioquina regulada por activación hepática (LARC), proteína-3 α inflamatoria de macrófagos (MIP-3 α) o Exodus-1 es una proteína de 96 AA que se expresa principalmente en el hígado y en el tejido linfoide (Hieshima et al., 1997). Tras la secreción, CCL20 ejerce su actividad mediante la unión al receptor 6 de la quimioquina CC (CCR6), que pertenece a la familia de receptores acoplados a la proteína G 1 (GPCR) (Baba et al., 1997). La expresión de CCR6 se ha notificado para varios subgrupos de leucocitos, pero está mejor documentada en la población de linfocitos Th17 (Singh et al., 2008). La función de Th17 normal es indispensable en la inmunidad protectora contra una gama de patógenos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* (Khader et al., 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Ye et al., 2001) y *Bordetella pertussis* (Higgins et al., 2006).

Los efectos potenciadores de IL-1 β sobre la expansión y la diferenciación de los diferentes subconjuntos de linfocitos T, especialmente los linfocitos Th17 (Sutton et al., 2006; Acosta-Rodriguez et al., 2007; Dunne et al., 2010; Shaw et al., 2012) se han establecido de forma sólida. Entre los subgrupos de linfocitos T, los linfocitos Th17 expresan los niveles más elevados de la IL-1R e IL-1 tiene un papel importante en el cebado de Th17. La actividad agonista controlada de IL-1 podría tener aplicaciones, por tanto, en diferentes procesos fisiológicos/patológicos, donde los efectos inmuoestimuladores serían deseables. Una de las principales preocupaciones respecto al uso de IL-1 en terapias inmuoestimuladoras es, sin embargo, su toxicidad grave cuando se administra de forma sistémica. Por lo tanto, si la acción de la IL-1 se pudiera confinar a una población celular seleccionada, el problema de toxicidad

debería resolverse, lo que abre perspectivas terapéuticas, por ejemplo, para su uso como adyuvante de linfocitos T para potenciar la respuesta a vacunas débiles (Ben-Sasson et al., 2011). Para dirigir específicamente IL-1 mutantes a la población de linfocitos Th17, se han utilizado variantes de IL-1 que consisten en una IL-1 mutante fusionada con un resto de direccionamiento de CCL20. Puesto que la activación se limitará a las células que expresan CCR6 (es decir, linfocitos Th17) solamente, no se espera toxicidad sistémica importante.

TNF α / Leptina mutante

TNF α es una citoquina con una amplia gama de actividades biológicas incluyendo citotoxicidad, regulación de células inmunitarias, y mediación de respuestas inflamatorias. Se trata de una proteína transmembrana autoensamblante homotrímica de tipo II unida no covalentemente de 233 aminoácidos. TNF α es una proteína activa tanto unida a membrana como en forma soluble, liberada desde la membrana celular después de la escisión proteolítica de los 76 aminoácidos aminoterminales (presecuencia) mediante la enzima convertora de TNF α (TACE, también denominada ADAM17). Esta señala mediante 2 receptores diferentes, TNF-R1 (p55) y TNF-R2 (p75), ambas glicoproteínas transmembrana con un motivo rico en cisteína en el dominio extracelular de unión al ligando. A pesar de la homología extracelular, tienen diferentes dominios intracelulares y, por tanto, señalizan diferentes actividades de TNF (Hehlgans & Pfeffer, 2005). Los inventores generaron una variante monocatenaria (scTNF) que consiste en tres monómeros de TNF acoplados mediante enlazadores GGGGS, como se ha descrito anteriormente en Boschert *et al.*, 2010.

Leptina es una citoquina adipocítica de 16 kDa que interviene en múltiples procesos biológicos, incluyendo inmunidad, reproducción, crecimiento lineal, homeostasis de la glucosa, metabolismo óseo y oxidación de la grasa, pero es mejor conocida por su importante efecto como señal de saciedad (Halaas et al., 1995). Debido a su efecto sobre las células inmunitarias, la leptina también está implicada en varias enfermedades autoinmunitarias (Iikuni et al., 2008). El direccionamiento selectivo de la actividad leptina puede ser beneficioso para los trastornos metabólicos como los relacionados tanto con el sistema inmunitario como con la inflamación.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una proteína de fusión, que comprende al menos dos citoquinas que comprenden CCL20 e IL-1 β , de las que al menos una citoquina es una citoquina modificada que muestra una actividad de unión fuertemente reducida a su receptor, o al menos a uno de sus receptores, si es posible la unión a diferentes receptores. Una afinidad de unión reducida, tal como se usa en el presente documento, significa que la afinidad es menos del 50 %, preferentemente menos del 40%, más preferentemente menos del 30%, más preferentemente más del 25%, más preferentemente menos del 20%, más preferentemente menos del 15%, más preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5%, lo más preferentemente menos del 1% de la citoquina natural. "Citoquina natural" tal como se usa aquí, significa la citoquina tal como se encuentra en la naturaleza, en el organismo hospedador. La modificación de la citoquina resultante en una reducción en la afinidad de unión puede ser una modificación que reduzca la actividad de la citoquina natural normal, o puede ser una modificación que aumenta la afinidad de una citoquina homóloga no endógena (tal como, aunque no de forma limitativa, una citoquina de ratón, que se une a un receptor de citoquina humana). Las modificaciones pueden ser cualquier modificación que disminuya o aumente la actividad, conocida por la persona experta en la materia, incluyendo, aunque no de forma limitativa, modificaciones químicas y/o enzimáticas tales como la pegilación y la glicosilación, la fusión con otras proteínas y mutaciones. Preferentemente, la citoquina con una afinidad de unión reducida por el receptor es una citoquina mutante. La mutación puede ser cualquier mutación conocida por los expertos en la materia, incluyendo deleciones, inserciones, truncamientos o mutaciones puntuales. Preferentemente, dicha mutación es una mutación puntual o una combinación de mutaciones puntuales. La afinidad se puede medir por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Como un ejemplo no limitativo, la afinidad del ligando respecto al receptor se puede medir según un análisis del gráfico de Scatchard y ajuste informático de los datos de unión (por ejemplo, Scatchard, 1949) o mediante espectroscopia reflectométrica por interferencia en condiciones de flujo pistón, como se describe en Brecht et al. (1993).

Como alternativa, la actividad de unión reducida se puede medir como la reducción de la actividad biológica del ligando mutante, en comparación con el ligando natural. En una realización preferida, dicha actividad biológica se mide *in vitro*, usando un ensayo con indicadores. Dichos ensayos indicadores dependen del sistema receptor de citoquinas utilizado, y son conocidos del experto en la técnica. Como un ejemplo no limitativo, se describe un ensayo con indicadores de IFN- γ en Bono et al (1989) junto con el análisis de Scatchard. Preferentemente, la actividad biológica del mutante es menos del 50%, preferentemente menos del 40%, más preferentemente menos del 30%, más preferentemente más del 25%, más preferentemente menos del 20%, más preferentemente menos del 15%, más preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5%, lo más preferentemente menos del 1% de la citoquina natural.

La citoquina modificada se fusiona con otra citoquina, modificada o no. Preferentemente, ambas citoquinas se fusionan con una secuencia enlazadora, preferentemente un enlazador GGS, que comprende una o más repeticiones de GGS. La citoquina modificada se puede situar en la parte del extremo amino de la molécula, o en la parte del extremo carboxi; la proteína de fusión puede comprender otros dominios tales como, aunque no de forma limitativa, una secuencia tag, una secuencia señal, otra citoquina o un anticuerpo.

En una realización preferida, dicha fusión es una fusión entre CCL20 y un mutante IL1 β . Preferentemente, dicho mutante IL1 β es un mutante Q148G.

Otro aspecto de la invención es una proteína de fusión de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida, se trata de una proteína de fusión de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En otra realización preferida, se trata de una proteína de fusión de acuerdo con la invención para su uso en la modulación de la respuesta inmunitaria.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de los elementos estructurales de la proteína de fusión XCL1 / IFN α 2-Q124R.

Figura 2: Actividad selectiva de la proteína de fusión XCL1 / IFN α 2-Q124R en células que expresan XCR1. La fosforilación de STAT1 Y701 se midió en respuesta a IFN α / β o la proteína de fusión XCL1 / IFN α 2-Q124R en diferentes subconjuntos de esplenocitos de ratón, caracterizados por la expresión de CD11c y CD8 α . Primera columna: subgrupo CD11c⁻ CD8 α ⁺; segunda columna: subgrupo CD11c⁻ CD8 α ⁻; tercera columna: subgrupo CD11c^{medio} CD8 α ⁻; cuarta columna: subgrupo CD11c^{alto} CD8 α ⁺; quinta columna: subgrupo CD11c^{alto} CD8 α ⁻.

Figura 3: Representación esquemática de los elementos estructurales en la proteína de fusión de IL-1 β -mutante / CCL20.

Figura 4: Actividad selectiva de las proteínas de fusión IL-1 β mutante / CCL20 en células que expresan CCL6.

(A) inducción de actividad NF κ B con IL-1 β natural y 5 mutantes de IL-1 β diferentes, fusionada a CCL20.

(B) dependencia de la concentración para la inducción de la actividad NF κ B mediante el IL-1 β natural y las proteínas de fusión IL-1 β Q148G mutante / CCL20, en células transfectadas de forma simulada, o células transfectadas con CCR6.

(C) inducción de actividad NF κ B con IL-1 β natural y las proteínas de fusión IL-1 β Q148G mutante / CCL20 (12,5 ng/ml), en células transfectadas de forma simulada, o células transfectadas con CCR6, en comparación con la inducción por vehículo.

Figura 5: Representación esquemática de los elementos estructurales de la proteína de fusión scTNF α / Leptina mutante.

Figura 6: Actividad de las proteínas de fusión scTNF α / Leptina mutante sobre las células que expresan el receptor de leptina. Crecimiento dependiente de leptina inducido por las concentraciones indicadas de scTNF dirigido por leptina natural o mutante, medido mediante el ensayo de XTT en células Ba/F3-mLR (panel A) o células Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt (panel B).

Figura 7: Direccionamiento in vivo de la actividad de IFN en esplenocitos de ratón que expresan XCR1. Ratonos C57Bl/6 recibieron una inyección i.v. con la cantidad indicada de XCL1-IFN α 2-Q124R o con 1 000 000 de unidades de IFN α / β natural de murino o PBS. Después de 45 min, los esplenocitos se analizaron por FACS para determinar la expresión de CD11c y CD8 α (primer panel) y de P-STAT1 (resto de paneles) en la siguiente población celular: CD11c-CD8 α ⁻ (línea 1), CD11c-CD8 α ⁺ (línea 2), CD11c⁺ CD8 α ⁺ (línea 3), CD11c⁺CD8 α ⁻ (línea 4).

Ejemplos

Los ejemplos no incluidos en el ámbito de las reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos.

Materiales y métodos de los ejemplos

Clonación y producción de las fusosquinas

Clonación de la proteína de fusión XCL1/ IFN α 2-Q124R.

El marco de lectura abierto XCL1 se sintetizó mediante la PCR a partir del plásmido MR200473 que codifica XCL1 (Origen Inc.), usando el sistema Expand High Fidelity PCR (Roche Diagnostics) y los siguientes cebadores:

Directo: 5'GGGGGGGAATTCATGAGACTTCTCCTCCTGAC3'
Inverso: 5'GGGGGGTCCGGAGGCCAGTCAGGGTTATCGCTG3'

El producto de la PCR se digirió con EcoRI y BspEI y se sustituyó en el fragmento EcoRI-BspEI que codifica el

nanocuerpo en el vector pMET7 SigK-HA-1R59B-His-PAS-ybbr-IFN α 2-Q124R (PCT/EP2013/050787).

Producción de la proteína de fusión XCL1/IFN α 2-Q124R.

5 Se transfectaron células Hek 293T con la construcción de la proteína de fusión usando el método normalizado de la lipofectamina (Invitrogen). 48 horas después de la transfección, se recogió el medio de cultivo y se almacenó a -20°C. Se analizó la actividad IFN en las líneas celulares HL116 humana y LL171 murina, tal como se describe (Uzé et al. J. Mol. Biol. 1994) usando la preparación purificada Nanobody GFP-IFN α 2-Q124R (descrita en el documento PCT/EP2013/050787) como patrón.

10

Clonación de las proteínas de fusión IL-1 β /CCL20.

15 Una secuencia optimizada por codones que codifica la proteína de fusión IL-1 β / CCL20 madura humana se generó mediante síntesis génica (Invitrogen Gene Art). En resumen, se sintetizó una secuencia en la que la proteína IL-1 β madura humana, precedida por el péptido líder SigK y provista con un HA en el extremo N, se fusionó por su extremo C a una secuencia enlazadora 13xGGS, seguido por la secuencia de CCL20 madura humana con una etiqueta His en el extremo C (Fig. 3).

20 Se seleccionaron IL-1 β mutantes con expectativa de tener una afinidad de unión reducida por IL-1R basándose en la bibliografía y en análisis de las estructuras publicadas del cristal del IL-1 β humano complejado con su receptor. Las mutaciones en el resto hIL-1 β se crearon mediante mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange, Stratagene) usando cebadores de mutagénesis como se indica en la tabla:

	Cebador Dir	Cebador Inv
R120G	GCGGCAGCGCCCTGTGCGAAGCTTGAAGCTGCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAGGGGC GCTGCCGC
Q131G	CTGCGGACAGCCAGGGGAAAGGCCTGGTCATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTTCCCCCTGGCTGTCCC GCAG
H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTGCCTTCA GCTCG
Q148G	GAAGGCACTGCATCTGGGTGCCAGGACATGGAACAGC	GCTGTTCCATGTCTGGCCACCAGATGCAGTG CCTTC
K209A	CCCCAAGAACTACCCCAAGGCAAAAGATGGAAAAGCGCT TCGTGTTCAAC	GTTGAACACGAAGCGCTTCCATCTTTGCCTT GGGTAGTCTTGGGG

Producción de IL-1 β mutante: Proteínas de fusión CCL20.

Las proteínas de fusión IL-1 β -CCL20 se produjeron en células HEK293T. Para la producción a pequeña escala, las células HEK293T se sembraron en placas de 6 pocillos a 400000 células/pocillo en DMEM suplementado con FCS al 10%. Después de 24 horas, el medio de cultivo se sustituyó por medio reducido en suero (DMEM/FCS al 5%) y las células se transfectaron usando PEI lineal. En resumen, la mezcla de transfección PEI se preparó combinando 1 μ g de vector de expresión con 5 μ g de PEI en 160 μ l de DMEM, se incubó durante 10 a TA y se añadió a los pocillos gota a gota. Después de 24 horas, las células transfectadas se lavaron con DMEM y se distribuyeron en capas con 1,5 ml de OptiMem/pocillo para la producción de proteínas. El medio condicionado se recuperó después de 48 horas, se filtró con filtros de 0,45 μ y se almacenaron a -20°C. El contenido de IL-1 β en el medio condicionado se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems).

Clonación de las proteínas de fusión scTNF / Leptina.

Las secuencias de codificación de la leptina natural (WT), L86S y L86N se sintetizaron mediante la PCR a partir de plásmidos pMet7 que expresan la leptina natural, Leptina L86S o Leptina L86N, respectivamente, utilizando los siguientes cebadores:

directo 5'-GCAGATCTGTCGACATCCAGAAAGTCCAGGATGACACC-3',
 inverso 5'-CGATGCGGCCGCACATTCAGGGCTAACATCCAACACTGT-3'.

Esto introduce un sitio BglII y uno NotI en los extremos amino y carboxi, respectivamente, de la secuencia de codificación de la leptina. El producto de la PCR se digirió con BglII y NotI y se clonó en el pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-6xGGGS-FLAG (scTNF natural se generó mediante síntesis génica, GeneArt) abierta con BglII y NotI, que se encuentran entre 6xGGGS y FLAG. Esto generó pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-6xGGGS-mLeptin-FLAG, pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-6xGGGS-mLeptin L86S-FLAG y pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-6xGGGS-mLeptin L86N-FLAG.

Producción de las proteínas de fusión scTNF/Leptina.

Se transfectaron células HekT con las diferentes construcciones de proteínas de fusión usando el método de precipitación con fosfato de calcio convencional. 48 horas después de la transfección, los medios de cultivo se recogieron y se almacenaron a -20°C. La concentración se determinó con un ELISA comercial para hTNF α (DY210, R&D systems).

Líneas celulares

Líneas celulares Hek 293T, HL116 y LL171 se hicieron crecer en DMEM suplementado con FCS al 10%. Las células Ba/F3-mLR y Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt se mantuvieron en RPMI suplementado con FCS al 10% inactivado térmicamente y 100 ng/ml de leptina.

Ensayos

Ensayo Phospho STAT1.

Se prepararon suspensiones monocelulares a partir de esplenocitos aislados de ratones C57Bl/6. Los eritrocitos se eliminaron mediante tampón de lisis de glóbulos rojos (Lonza). Los esplenocitos se trataron durante 30 min con IFN α / β de ratón o proteína de fusión XCL1-IFN α 2-Q124R en suero de feto de ternera con RPMI al 5% a 37°C y a continuación se marcaron con anticuerpo de ratón dirigido contra STAT1 PE BD Phosflow (pY701) junto con anticuerpo dirigido contra CD11c de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (eBioscience n.º 53-0114-80) y anticuerpo dirigido contra CD8 α de ratón marcado con APC (BD Bioscience n.º 553035) o anticuerpo dirigido contra CD11c de ratón y anticuerpo dirigido contra CD8 α de ratón marcado con Alexa 488, según las instrucciones de BD Biosciences. Se adquirieron los datos FACS usando un BD FACS Canto y se analizaron con cualquier programa informático Diva (BD Biosciences).

Ensayo del gen indicador NF- κ B.

Para evaluar la activación de IL-1R, los inventores utilizaron células HEK-Blue™ IL-1 β que expresan IL-1R de manera estable (Invivogen) y se transfectaron transitoriamente con un gen indicador de la luciferasa NF- κ B. En resumen, las células HEK-Blue™ IL-1 β se sembraron en medio de cultivo (DMEM/FCS al 10%) en placas de 96 pocillos (10000 células/pocillo) y se transfectaron el día siguiente usando el método de precipitación con fosfato de calcio, con las cantidades indicadas de plásmidos de expresión y 5 ng/pocillo del plásmido del gen indicador 3kB-Luc (Vanden Berghe et al., 1998). A las 24 horas de la transfección, el medio de cultivo se sustituyó por medio sin nutrientes (DMEM) y 48 horas después de la transfección, las células se indujeron durante 6 horas con proteínas de fusión IL1-CCL20. Tras la inducción, las células se lisaron y se determinó la actividad luciferasa en los lisatos usando el Promega Firefly Luciferase Assay System en un luminómetro Berthold centro LB960.

Ensayo de proliferación de linfocitos.

La línea celular Ba/F3-mLR se generó mediante electroporación de células Ba/F3 con el vector pMet7-mLR. Se seleccionaron células que expresaban de forma estable por crecimiento de las mismas sobre leptina en lugar de IL-3. De hecho, el crecimiento de células Ba/F3 es dependiente de IL-3, pero cuando expresan MLR, también proliferan sobre leptina. Para obtener la línea celular Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt, células Ba/F3-mLR se transfectaron simultáneamente con pMet7-HA-hTNFR1ΔCyt y pIRESpuro2 (Clontech) seguido por selección con puromicina y clasificación según FACS de las células que expresan hTNFR1ΔCyt.

Para evaluar la proliferación celular, se lavaron las células Ba/F3-mLR y Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt, se sembraron en RPMI/FCS al 10% en placas de 96 pocillos (10000 células/pocillo) y se estimularon con las cantidades indicadas de leptina o proteínas de fusión. Cuatro días después, se añadieron 50 ul de XTT (XTT Cell Proliferation Kit II, Roche 11 465 015 001) y se incubaron durante 4 h antes de medir la absorbancia a 450 nm.

Ejemplo 1: La actividad IFN de la proteína de fusión XCL1 / IFNα2-Q124R se restaura en células que expresan XCR1.

Los esplenocitos de ratón se trataron durante 30 minutos con XCL1-IFNα2-Q124R 1 nM o con 10000 unidades/ml de IFNα/β de ratón. A continuación, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpo dirigido contra phospho STAT1 (PE), anticuerpo dirigido contra CD11c (Alexa Fluor 488) y anticuerpo dirigido contra CD8α (APC) y se analizaron por FACS. La Figura 2 muestra que el IFN α/β de ratón indujo la fosforilación de STAT1 en todos los subgrupos de esplenocitos analizados. Por el contrario, la proteína de fusión XCL1-IFNα2-Q124R, indujo una respuesta de IFN solamente en la mayoría de las células pertenecientes al subgrupo CD11c⁺ CD8α⁺ y en una minoría de las células pertenecientes al subgrupo CD11c⁺ CD8α⁻. La distribución de los subgrupos de esplenocitos sensibles a la proteína de fusión XCL1-IFNα2-Q124R corresponde perfectamente la distribución esperada de XCR1, el receptor XCL1 (Dorner et al. 2009).

Ejemplo 2: La actividad de IL1β se restaura en las células que expresan CCR6

Células HEK-Blue™ IL-1β, que expresan de manera estable la IL-1R, se transfectaron transitoriamente con un plásmido del gen indicador NF-κB (5 ng/pocillo) y un vector vacío o un plásmido de expresión hCCR6 (10 ng/pocillo). Células transfectadas de forma simulada y transfectadas con CCR6 se trataron a continuación durante 6 horas con IL1β natural o las proteínas de fusión IL1β mutante-CCL20 (25 ng/ml), después de lo cual, las células se lisaron y se determinó la actividad del gen indicador NF-κB. Como es evidente de la Fig. 4A, las células que expresan CCR6 respondieron con una mayor actividad del gen indicador NF-κB para todas las proteínas de fusión IL1β mutante-CCL20 en comparación con las células transfectadas de forma simulada. Para evaluar el efecto del mutante IL-1β-Q148G, para el que el efecto de direccionamiento fue más evidente, con más detalle, células HEK-Blue™ IL-1β transfectadas de forma simulada o que expresaban CCR6 se trataron durante 6 horas con dosis crecientes de IL-1β WT o la proteína de fusión IL-1βQ148G-CCL20. La Fig. 4B demuestra que la expresión en exceso de CCR6 aumentó la actividad de la fusión IL-1βWT-CCL20, pero tiene un efecto potenciador más intenso para la fusión IL-1βQ148G-CCL20. El efecto de direccionamiento fue más evidente cuando se aplicó IL-1β-CCL20 a las células a 12,5 ng/ml (Fig. 4C).

Ejemplo 3: La actividad leptina se restaura en las células que expresan TNFR

Se evaluó la proliferación de células Ba/F3-mLR y Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt después de 4 días de estimulación con las cantidades indicadas de leptina o las proteínas de fusión leptina-scTNF. Como se muestra en la Figura 6A, ambas líneas celulares no proliferan en medio de crecimiento suplementado solamente con suero inactivado térmicamente. Además, la capacidad de la leptina para inducir la proliferación de Ba/F3 se reduce cuando se acopla a scTNF. La mutación L86 en la leptina WT a una serina (L86S) o una asparagina (L86N) da como resultado una reducción moderada o intensa de la afinidad respecto al receptor de leptina de ratón, respectivamente. Esta reducción en la afinidad se traduce en una inducción de la proliferación menos potente, de 3 frente a 10 veces, de las células Ba/F3-mLR para la leptina L86S en comparación con L86N, respectivamente. La transfección adicional de las células Ba/F3-mLR con el TNF-R1 humano que carece de su dominio intracelular (hTNFR1ΔCyt) introduce un receptor no funcional, que puede funcionar como un marcador extracelular unido a la membrana. De manera clara, la respuesta proliferativa tras la estimulación con las leptinas mutantes L86S y L86N acopladas con scTNF queda completamente restaurada en células Ba/F3-mLR que expresan la hTNFR1ΔCyt (Figura 6B).

Ejemplo 4: Direccionamiento in vivo de una población de células que expresa XCR1

De acuerdo con Bachem et al. (Frontiers in Immunology 3, 1-12. 2012), las células que expresan XCR1 representan la mayor parte de la población de esplenocitos CD11c⁺ CD8α⁺ y una parte minoritaria de la población de esplenocitos CD11c⁺ CD8α⁻. Ratones C57Bl/6 recibieron una inyección i.v. con la cantidad indicada de XCL1-IFNα2-Q124R o con 1 000 000 de unidades de IFNα/β natural de murino o PBS. Después de 45 min, los esplenocitos se analizaron por FACS para determinar P-STAT1 en las siguientes poblaciones de células: CD11c-CD8α⁻, CD11c-CD8α⁺, CD11c⁺ CD8α⁺, CD11c⁺ CD8α⁻. En la Figura 7 se muestran los resultados. A partir de estos resultados, es

evidente que la construcción de fusión puede dirigir, e induce, una respuesta en una fracción minoritaria de la población (aproximadamente el 0,1% de las células totales), mientras que las células sensibles a IFN que no expresan el marcador no se ven afectadas. De hecho, el IFN natural también altera las células CD11c+ CD8 α -, mientras que aquellas células no alteradas mediante la construcción de fusión, proporcionan claramente la acción específica de la fusión.

REFERENCIAS

- 5 - Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A y Sallusto F. (2007) Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 8, 942-9.
- 10 - Acres B, Gantzer M, Remy C, Futin N, Accart N, Chaloin O, Hoebeke J, Balloul JM y Paul S. (2005). Fusokine interleukin-2/interleukin-18, a novel potent innate and adaptive immune stimulator with decreased toxicity. *Cancer Res.* 65, 9536-46.
- 15 - Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiya H y Yoshie O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem.* 272,14893-8.
- Bachem A, Hartung E, Güttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, Plantinga M, Mazzini E, Stoitzner P, Gurka S, Henn V, Mages HW y Kroczeck RA. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 3, 214. doi: 10,3389.
- 20 - Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Hu-Li J y Paul WE. (2011). IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine*, 56, 122-5.
- Bono MR, Benech P, Coullin P, Alcaide-Loridan C, Grisard MC, Join H, Fischer DG y Fellous M. (1989). Characterization of human IFN-gamma response using somatic cell hybrids of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Somat. Cell Mol. Genet.* 15, 513-23.
- 25 - Brecht A., Gauglitz G., Polster J. (1993). Interferometric immunoassay in a FIA-system - A sensitive and rapid approach in label-free immunosensing. , *Biosens Bioelectron* 8 : 387-392.
- Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, Vu Manh TP, Baranek T, Storset AK, Marvel J, Boudinot P, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I y Dalod M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1283-1292.
- 30 - Donahue RE, Seehra J, Metzger M, Lefebvre D, Rock B, Carbone S, Nathan DG, Garnick M, Sehgal PK, Laston D, et al. (1988). Human IL-3 and GM-CSF act synergistically in stimulating hematopoiesis in primates. *Science* 241, 1820-1823
- Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, Jack RS, Henn V y Kroczeck RA. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* 31, 823-833.
- 35 - Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P y Mills KH. (2010) Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol.* 185, 1711-9.
- 40 - Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM y Gajewski TF (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med.* 208, 2005-2016.
- Gaffen SL. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 23, 613-9.
- Gajewski TF, Fuertes MB y Woo SR (2012). Innate immune sensing of cancer: clues from an identified role for type I IFNs. *Cancer Immunol Immunother.* 61, 1343-7.
- 45 - Gillies SD, Lan Y, Brunkhorst B, Wong WK, Li Y, Lo KM. (2002). Bi-functional cytokine fusion proteins for gene therapy and antibody-targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 51, 449-460
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK y Friedman JM. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-6.
- 50 - Hehlgans T y Pfeffer, K (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 115, 1-20.
- Hieshima K, Imai T, Opendakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O y Nomiya H. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem.* 272, 5846-53.
- 55 - Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC y Mills KH. (2006). TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol.* 177, 7980-9.
- Idriss HT & Naismith JH (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique* 50, 184-95.
- 60 - Iikuni N, Lam QL, Lu L, Matarese G, La Cava A. (2008). Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev.* 4, 70-79.
- Jahn T, Zuther M, Friedrichs B, Heuser C, Gohlke S, Abken H, Hombach AA (2012). An IL12-IL2-antibody fusion protein targeting Hodgkin's lymphoma cells potentiates activation of NK and T cells for an anti-tumor attack. *PLoS One* 7:e44482.
- 65 - Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD y Cooper AM. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat*

- Immunol. 8, 369-77.
- Krippner-Heidenreich A, Grunwald I, Zimmermann G, Kühnle M, Gerspach J, Sterns T, Shnyder SD, Gill JH, Männel DN, Pfizenmaier K y Scheurich P. (2008). Single-chain TNF, a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral activity. *J Immunol.* 180, 8176-83.
 - 5 - Lu J, Peng Y, Zheng ZJ, Pan JH, Zhang Y, Bai Y (2008). EGF-IL-18 fusion protein as a potential anti-tumor reagent by induction of immune response and apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett* 260, 187-197.
 - Murzin AG, Lesk AM & Chothia C (1992). β -Trefoil fold: Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *Journal of Molecular Biology* 223, 531-543.
 - Nicola NA & Hilton DJ (1998). General classes and functions of four-helix bundle cytokines. *Advances in protein chemistry* 52, 1-65.
 - 10 - Nomiya H, Osada N y Yoshie O. (2013). Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells.* 18,1-16.
 - O'Shaughnessy JA, Tolcher A, Riseberg D, Venzon D, Zujewski J, Noone M, Gossard M, Danforth D, Jacobson J, Chang V, Goldspiel B, Keegan P, Giusti R y Cowan KH. (1996). Prospective, randomized trial of 5-fluorouracil, leucovorin, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in combination with the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) fusion protein (PIXY321) versus GM-CSF in patients with advanced breast cancer. *Blood* 87, 2205-2211
 - 15 - Penafuerte C, Bautista-Lopez N, Boulassel MR, Rauty JP y Galipeau J (2009). The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation. *Cancer Res* 69, 9020-9028
 - Rafei M, Wu JH, Annabi B, Lejeune L, François M y Galipeau J (2007). A GMCSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex. *Blood* 109, 2234-2242
 - Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, Li M, Forner K, Birman E, Boivin MN, Young YK, Perreault C y Galipeau J. (2009a). A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med* 15, 1038-1045
 - 20 - Rafei M, Campeau PM, Wu JH, Birman E, Forner K, Boivin MN y Galipeau J. (2009b) Selective inhibition of CCR2 expressing lymphomyeloid cells in experimental autoimmune encephalomyelitis by a GM-CSF-MCP1 fusokine. *J Immunol.* 182, 2620-7.
 - Rafei M, Berchiche YA, Birman E, Boivin MN, Young YK, Wu JH, Heveker N, y Galipeau J. (2009c) An engineered GM-CSF-CCL2 fusokine is a potent inhibitor of CCR2-driven inflammation as demonstrated in a murine model of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 183, 1759-66.
 - Rafei M, Deng J, Boivin MN, Williams P, Matulis SM, Yuan S, Birman E, Forner K, Yuan L, Castellino C, Boise LH, MacDonald TJ y Galipeau J. (2011) A MCP1 fusokine with CCR2-specific tumoricidal activity. *Mol Cancer.* 10:121. doi: 10.1186/1476-4598-10-121.
 - 25 - Shaw MH, Kamada N, Kim YG y Nunez G. (2012) Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med.* 209.251-8.
 - Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN y Farber JM. (2008) Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol.* 180, 214-21.
 - 30 - Scatchard G. (1949). *Ann New York Acad Sci* 51, 660-72.
 - Stagg J, Wu JH, Bouganis N y Galipeau J. (2004). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion cDNA for cancer gene immunotherapy. *Cancer Res* 64, 8795-8799
 - Sun PD & Davies DR. (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 24, 269-91.
 - 35 - Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH y Lavelle EC. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 203, 1685-91.
 - Weber H, Valenzuela D, Lujber G, Gubler M y Weissmann C. (1987). Single amino acid changes that render human IFN-alpha 2 biologically active on mouse cells. *EMBO J.* 6, 591-8.
 - Williams P, Bouchentouf M, Rafei M, Romieu-Mourez R, Hsieh J, Boivin MN, Yuan S, Forner KA, Birman E y Galipeau J. (2010a). A dendritic cell population generated by a fusion of GM-CSF and IL-21 induces tumor-antigen-specific immunity. *J Immunol.* 185, 7358-66.
 - 40 - Williams P, Rafei M, Bouchentouf M, Raven J, Yuan S, Cuerquis J, Forner KA, Birman E y Galipeau J. (2010b). A fusion of GMCSF and IL-21 initiates hypersignaling through the IL-21Ralpha chain with immune activating and tumoricidal effects in vivo. *Mol Ther* 18, 1293-1301.
 - 45 - Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ y Kolls JK. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 194, 519-27.

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW UNIVERSITEIT GENT CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2 CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER

65 <120> FUSOQUINAS QUE IMPLICAN CITOQUINAS CON AFINIDADES DE UNIÓN POR EL RECEPTOR
FUERTEMENTE REDUCIDAS

ES 2 657 060 T3

<130> JT/DUO/459
 <150> EP 13306034.3
 <151> 18/07/2013
 5 <160> 15
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 1
 20 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 2
 gggggggaat tcatgagact tctcctctg ac 32
 <210> 3
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 3
 ggggggtccg gaggcccagt cagggttacc gctg 34
 <210> 4
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 4
 gcggcagcgc cctgtcggga agcttgaact gcaccctgc 39
 <210> 5
 <211> 37
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 5
 ctgcgggaca gccaggggaa gagcctggtc atgagcg 37

ES 2 657 060 T3

<210> 6
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 10 cgagctgaag gcactggctc ttcaggcca ggacatgg 38
 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 7
 gaaggcactg catctgggtg gccaggacat ggaacagc 38
 <210> 8
 <211> 49
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 8
 cccaagaac tacccaagg caaagatgga aaagcgttc ggttcaac 49
 <210> 9
 <211> 39
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 9
 gcagggtgca gttcaagctt cgcacagggg cgctgccgc 39
 <210> 10
 <211> 37
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 10
 55 cgctcatgac caggctctc ccctggctgt cccgcag 37
 <210> 11
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 65 ccatgtctcg gccctgaaga gccagtcct tcagctcg 38

ES 2 657 060 T3

5
<210> 12
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 12
gctgttccat gtctggcca cccagatgca gtccttc 38

15 <210> 13
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 13
gttgaacacg aagcgctttt ccatcttgc ctgggtag ttctgggg 49

25 <210> 14
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 14
gcagatctgt cgacatccag aaagtcagg atgacacc 38

35 <210> 15
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 15
cgatgcgcc gcacattcag ggctaacatc caactgt 37

45

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una proteína de fusión que comprende al menos dos citoquinas,
5 en la que las citoquinas son CCL20 e IL-1 β , y
 en la que al menos una citoquina comprende una mutación que reduce fuertemente la actividad de unión a su receptor, y al menos una citoquina es una citoquina natural que proporciona un direccionamiento específico de célula que restaura la actividad de la citoquina mutante en las células diana.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un enlazador GGS.
3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, en la que IL-1 β comprende la mutación.
- 15 4. La composición de la reivindicación 3, en la que la mutación se selecciona entre R120G, Q131G, H146A, Q148G y K209A.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que la mutación es Q148G.
- 20 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la CCL20 es natural.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la modulación de la respuesta inmunitaria.

Figura 1



Figura 2

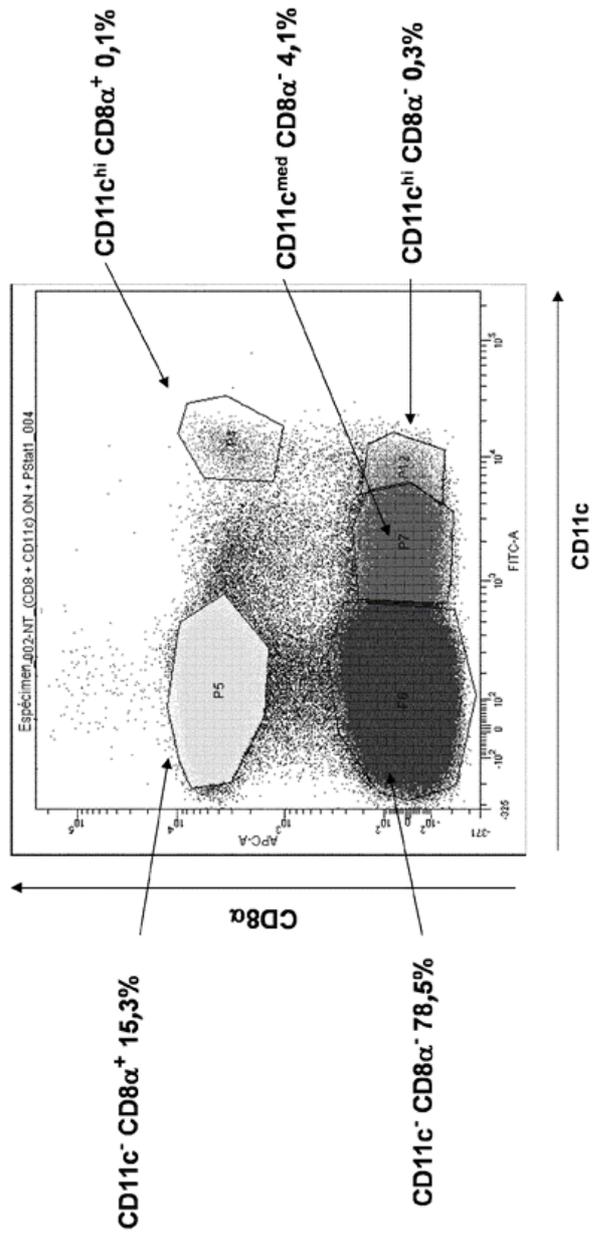


Figura 2 Continuación

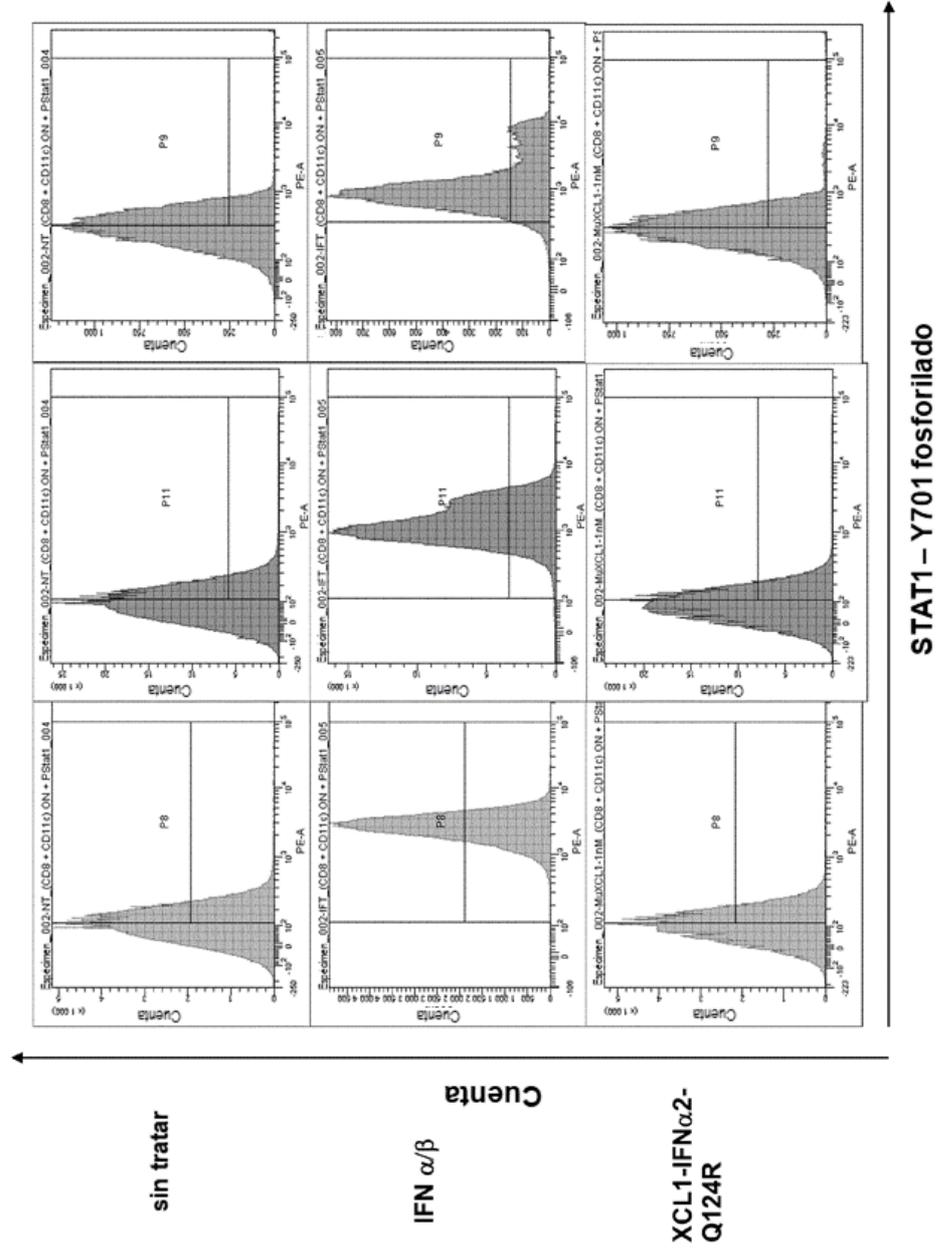


Figura 2 Continuación

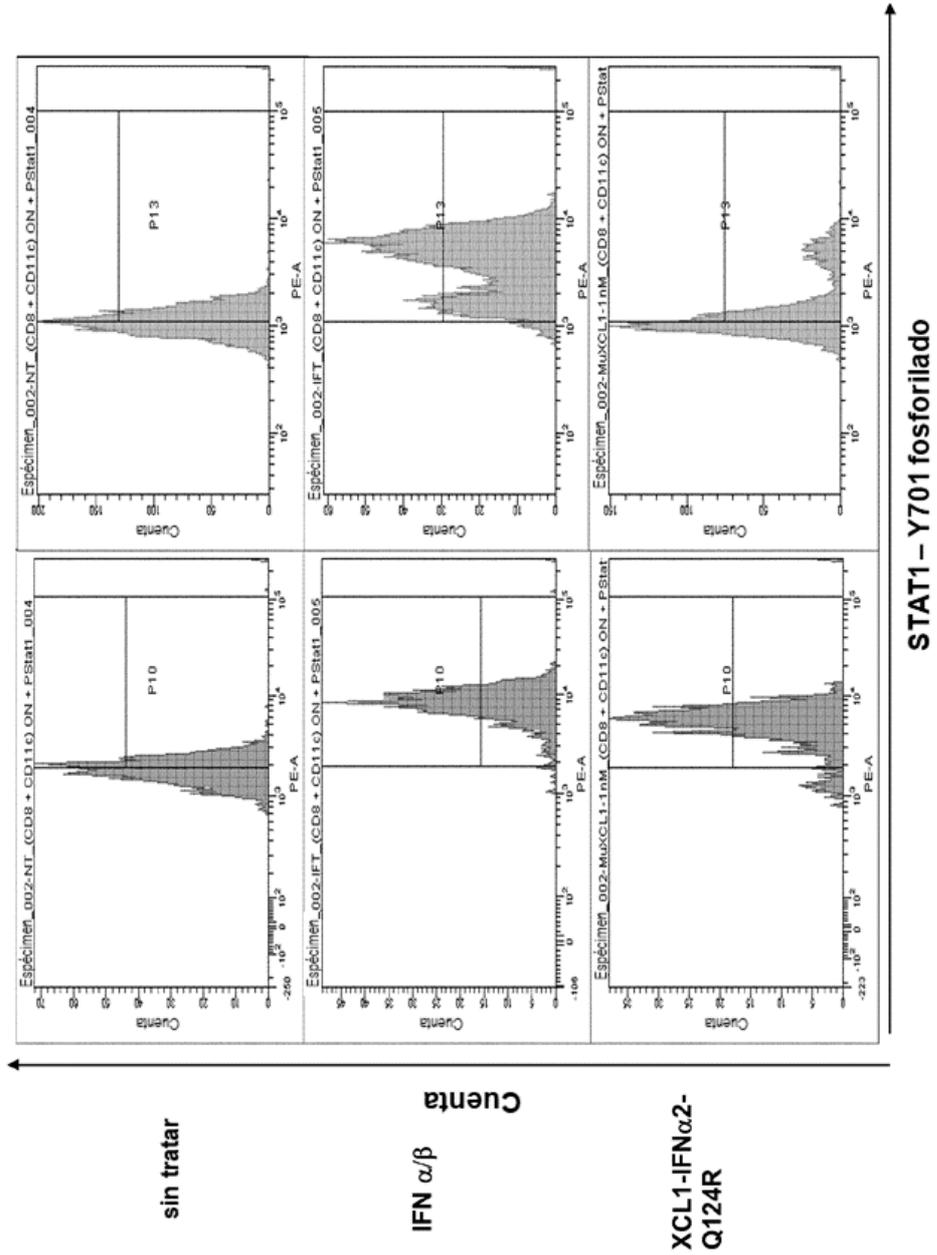


Figura 3



Figura 4

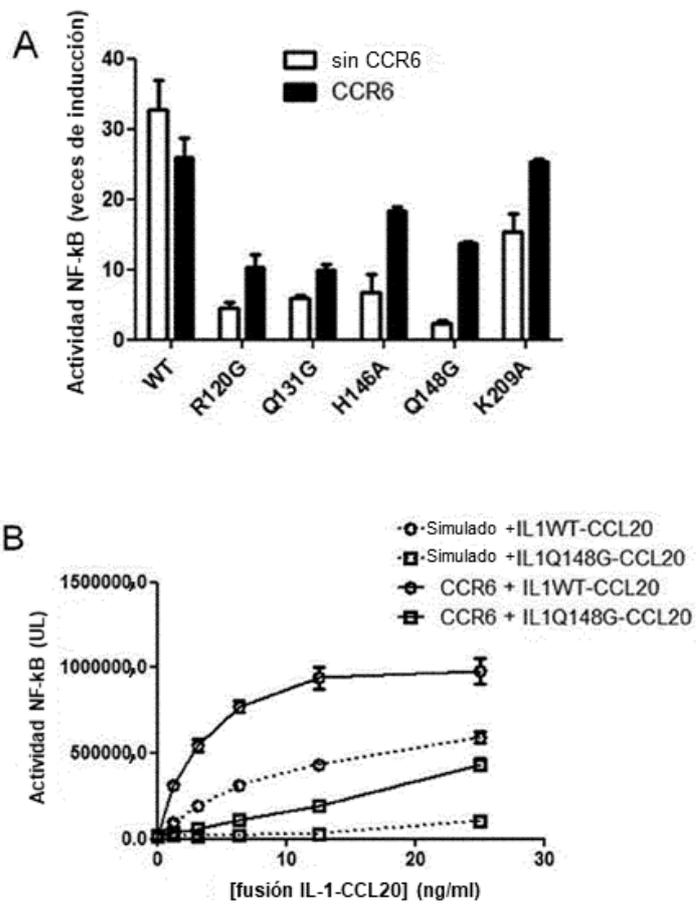


Figura 4 Continuación

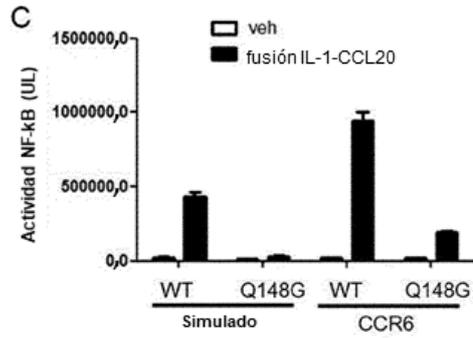


Figura 5



Figura 6

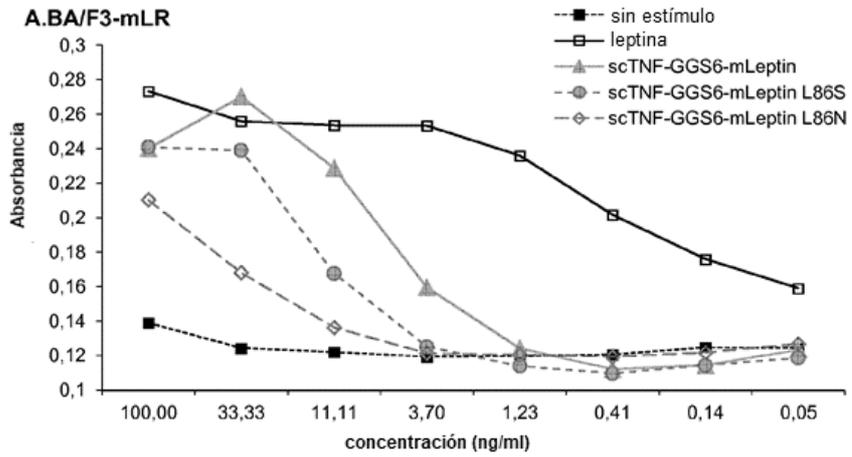


Figura 6 Continuación

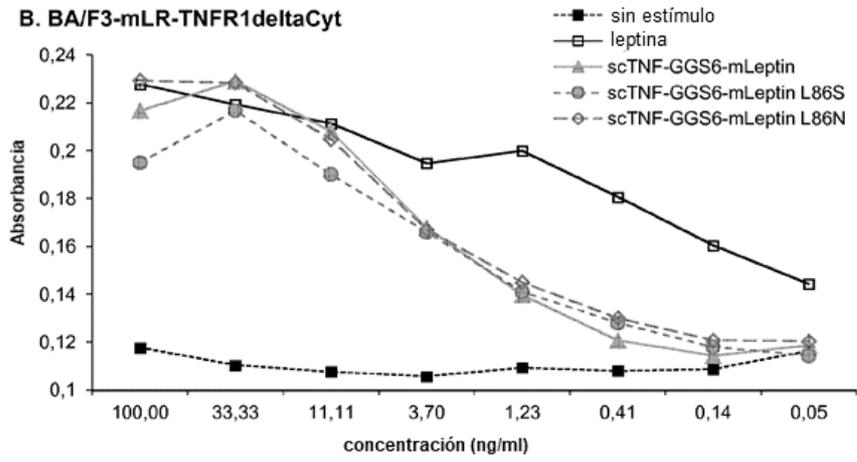


Figura 7

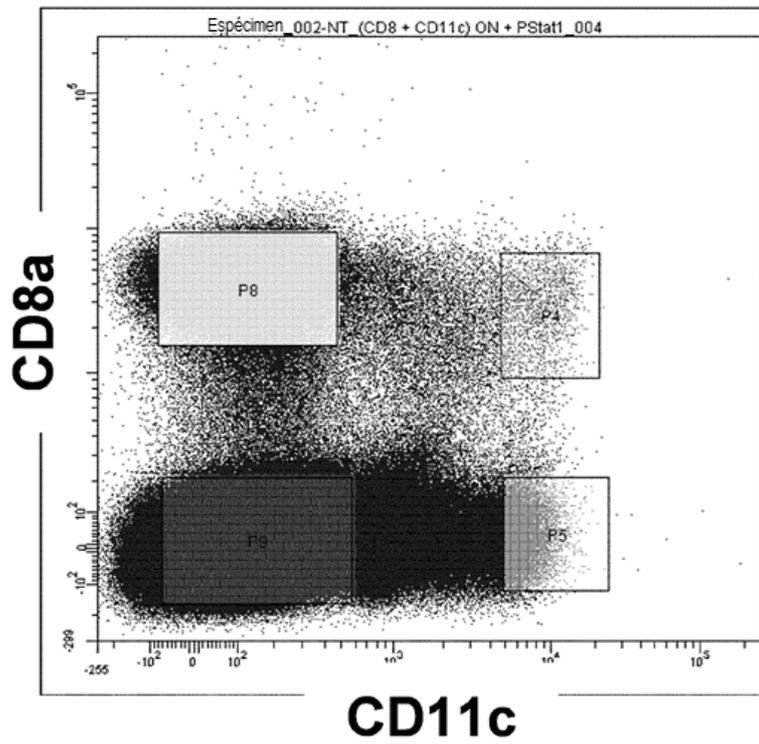


Figura 7 Continuación

PBS

IFN α 10⁶ UI

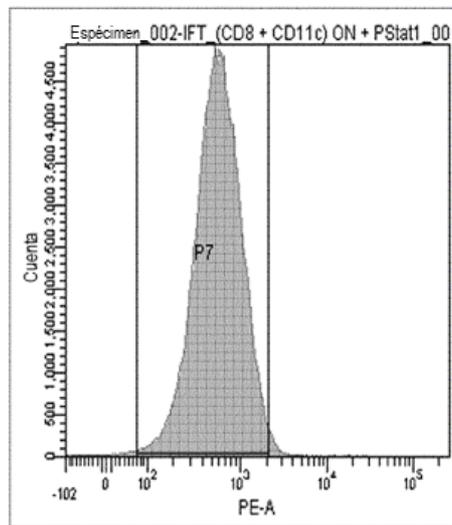
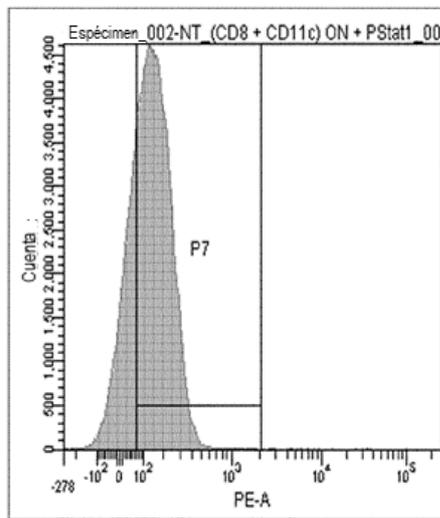
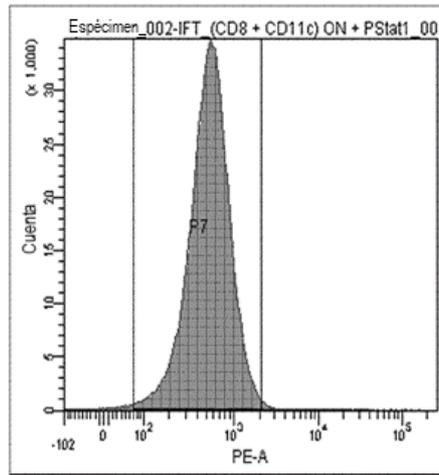
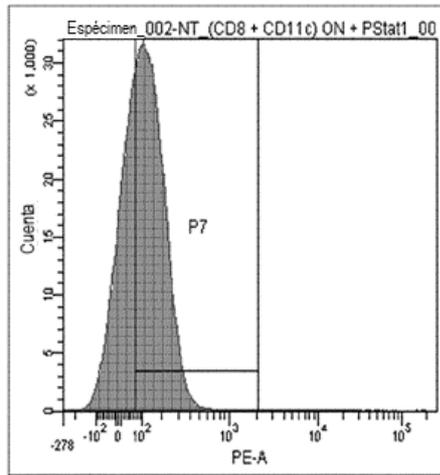


Figura 7 Continuación

PBS

IFN α β 10^{E6} UI

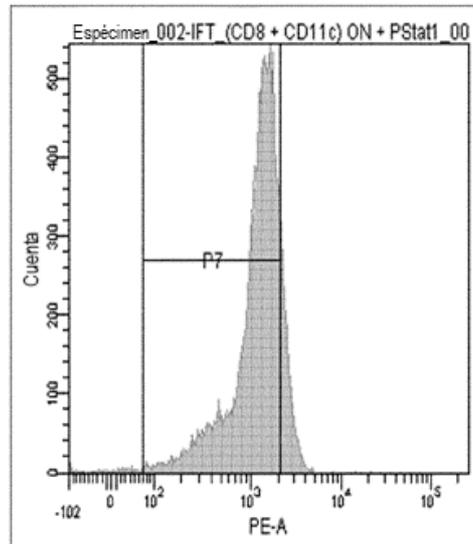
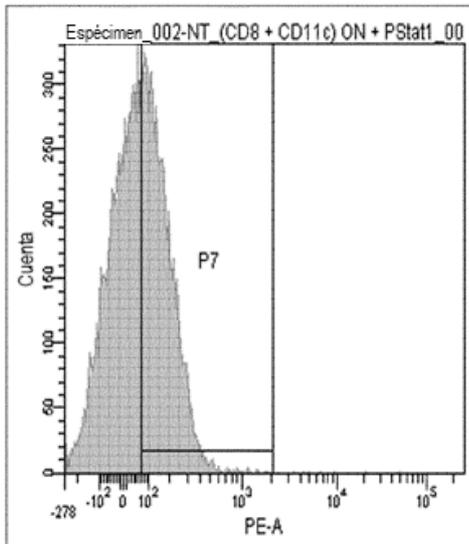
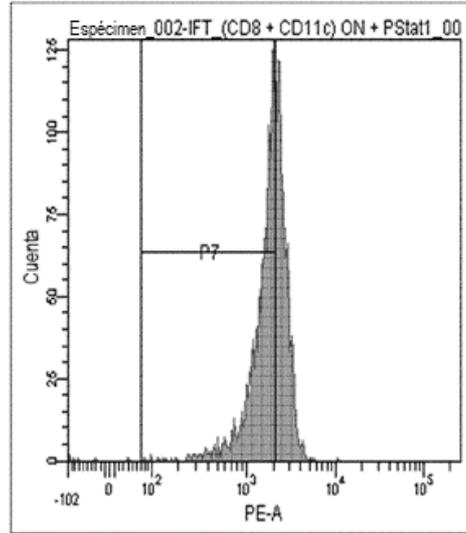
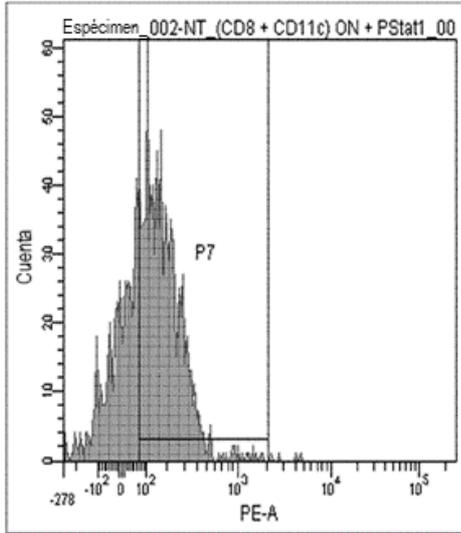


Figura 7 Continuación

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10µg

MuXCL1_IFNA2 Q124R 1µg

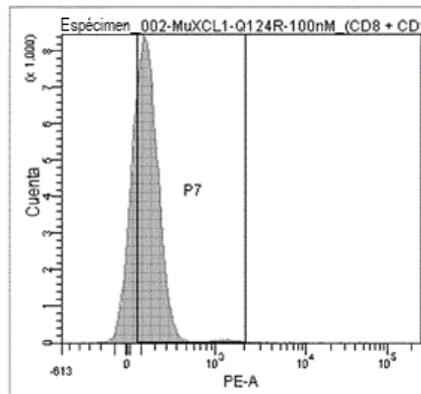
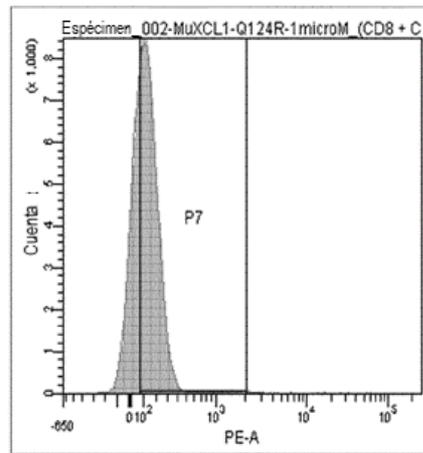
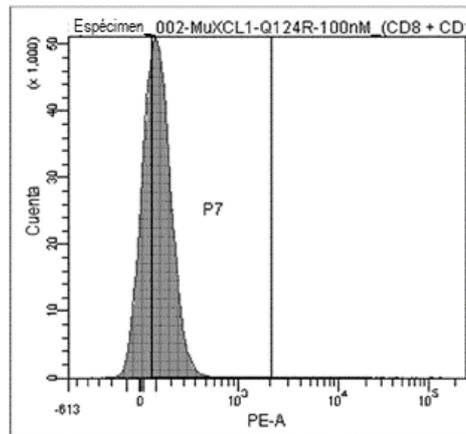
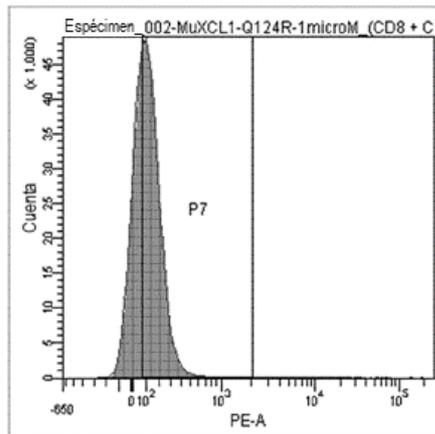


Figura 7 Continuación

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10µg

MuXCL1_IFNA2 Q124R 1µg

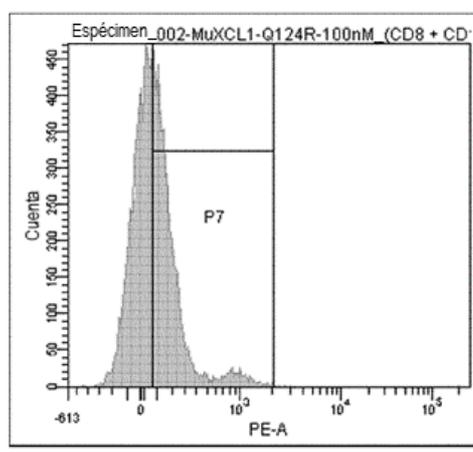
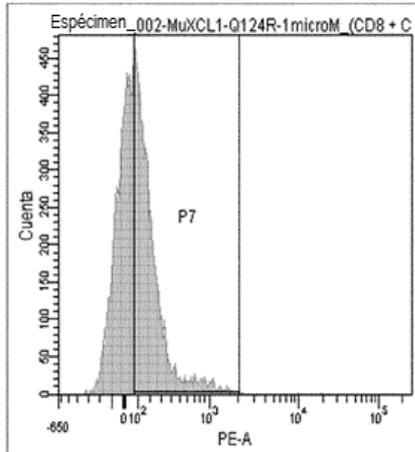
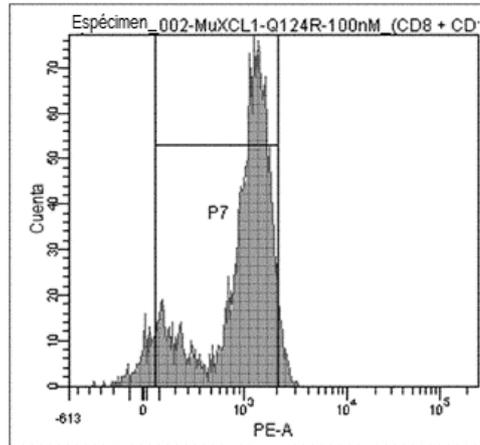
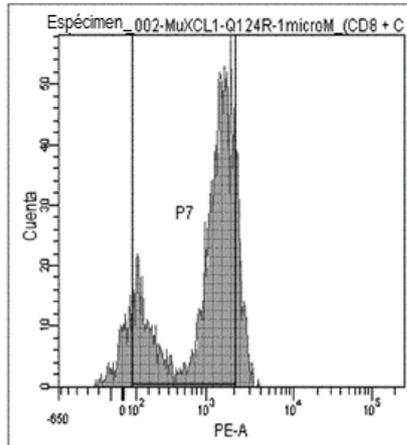


Figura 7 Continuación

MuXCL1_IFNA2 Q124R 100ng

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10ng

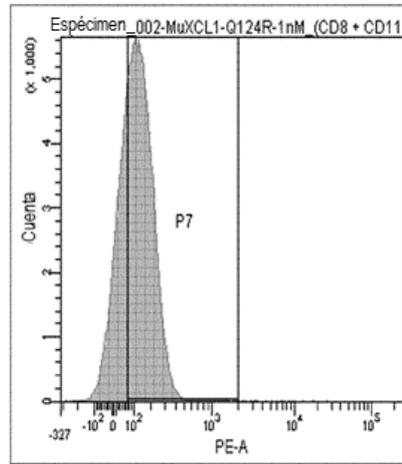
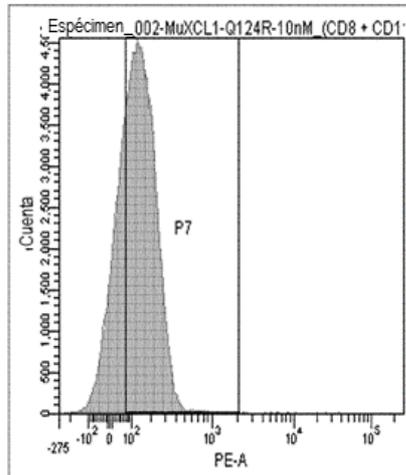
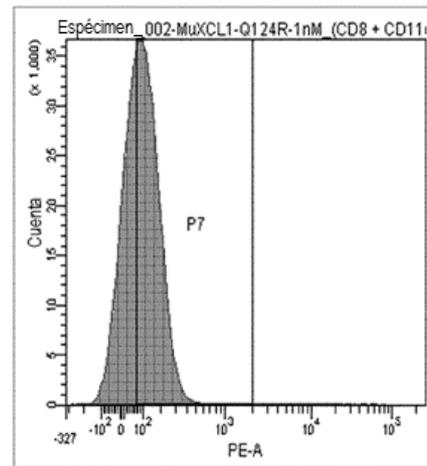
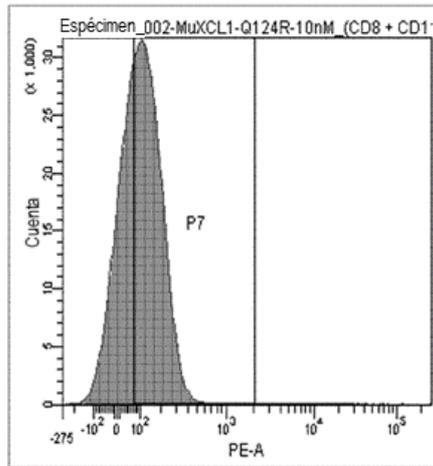


Figura 7 Continuación

MuXCL1_IFNA2 Q124R 100ng

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10ng

