

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 728**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/EP2012/070088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12780684 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2766035**

54 Título: **Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibidoras de linfocitos T para terapia tumoral**

30 Prioridad:

11.10.2011 EP 11184644

10.11.2011 EP 11188625

19.09.2012 EP 12185108

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH PROREKTORAT MNW
(100.0%)**

**Rämistrasse 71
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**BECHER, BURKHARD. y
VOM BERG, JOHANNES.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 671 728 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

Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibitoras de linfocitos T para terapia tumoral

La presente invención, tal como se define en las presentes reivindicaciones, se refiere a composiciones y a métodos para tratar cáncer, en particular, a inmunoterapia de neoplasias malignas tales como glioma, mediante la administración de una dosis eficaz de un polipéptido con actividad biológica de IL-12 y un ligando no agonista de una CTLA-4.

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor astrocítico más maligno. El GBM presenta un patrón de crecimiento invasivo y destructor; es el tumor cerebral primario maligno más común y más agresivo en seres humanos, que representa el 20 % de todos los tumores intracraneales. En la mayoría de los países europeos y en América del Norte, la frecuencia de GBM está en el intervalo de 3-3,5 casos nuevos por 100.000 habitantes al año. La historia clínica de la enfermedad es normalmente corta (menos de 3 meses en más del 50 % de los casos) y los pacientes diagnosticados con GBM presentan una supervivencia media de 14-18 meses, a pesar de la cirugía invasiva, de la radiación y de la quimioterapia. La capacidad de los gliomas para resistir a regímenes de tratamiento convencionales es uno de los mayores retos de la neurooncología moderna.

La interleucina (IL)-12 es el prototipo de un grupo de citocinas heterodiméricas con propiedades predominantemente inflamatorias. La IL-12 polariza a los linfocitos T colaboradores que no se han expuesto previamente (naïve) para que adopte un fenotipo TH1 y estimula a los linfocitos T citotóxicos y a las células NK. La IL-12 se une al receptor de IL-12 (IL-12R) que es un receptor heterodimérico formado por IL-12R-β1 e IL-12R-β2. El complejo del receptor se expresa principalmente por los linfocitos T, pero también se ha descubierto que otras subpoblaciones de linfocitos son sensibles a IL-12.

Se ha sugerido la aplicación terapéutica de IL-12 en diversas entidades tumorales. Los ensayos clínicos en pacientes de cáncer, sin embargo, se tuvieron que detener debido a que la aplicación sistémica provocó diversos acontecimientos adversos a dosis eficaces, incluyendo víctimas mortales. Aunque la investigación en los últimos años se ha centrado principalmente en diversas vías de administración de IL-12, aún permanecen abiertas cuestiones sobre el mecanismo exacto mediante el cual IL-12 ejerce sus propiedades supresoras de tumores.

CTLA-4 y PD-1 son ambos miembros de la extensa familia CD28/CTLA-4 de linfocitos T reguladores. PD-1 se expresa sobre la superficie de linfocitos B, macrófagos y linfocitos T activados. PD-1 (CD279; Uniprot Q15116) tiene dos ligandos, PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273), que son miembros de la familia B7.

CTLA-4 (N.º de ID de Uniprot P16410) se expresa sobre la superficie de linfocitos T colaboradores y transmite una señal inhibitoria a los linfocitos T. CTLA-4 y CD28 se unen a CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las células presentadoras de antígeno. CTLA-4 transmite una señal inhibitoria para linfocitos T, mientras que CD28 transmite una señal estimuladora. El tratamiento sistémico anti-CTLA-4 se ha aprobado para uso clínico y demuestra un beneficio clínico. Se está ensayando adicionalmente para otros diversos cánceres sólidos (Hodi et al., N Engl J Med 363, 711-723 (2010); Graziani et al., Pharmacol Res (2012) Ene;65(1):9-22). Está disponible un anticuerpo comercial contra CTLA-4 con el nombre genérico de ipilimumab (comercializado como Yervoy).

La glucoproteína inmunoglobulina G (IgG) es una molécula efectora principal de la respuesta inmunitaria humoral en el ser humano. Hay cuatro subgrupos distintos de IgG humana, denominados IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Las cuatro subclases presentan más del 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de las cadenas pesadas, pero difieren con respecto a la estructura y a la flexibilidad de la región bisagra, especialmente en el número de enlaces disulfuro intercatenarios de cadenas pesadas en este dominio. Las diferencias estructurales entre las subclases de IgG también se reflejan en su susceptibilidad a enzimas proteolíticas, tales como papaína, plasmina, tripsina y pepsina.

Solo se conoce una isoforma de IgG4 humana. Al contrario de la IgG1, la IgG2 y la IgG3 humanas, la IgG4 humana no activa el complemento. Además, la IgG4 es menos susceptible a enzimas proteolíticas en comparación con la IgG2 y la IgG3.

El problema subyacente de la presente invención es la provisión de medios mejorados y de métodos para tratar el cáncer sólido, en particular, glioma.

En el transcurso de un estudio centrado en el potencial terapéutico clínico de IL-12 en GBM de etapa avanzada en un modelo de roedores relevante, sorprendentemente se descubrió que la combinación de IL-12 con un bloqueo de señales co-inhibidoras con anticuerpo anti-CTLA-4 lleva a la erradicación casi completa del tumor y a la cura incluso en etapas avanzadas de la enfermedad.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un medicamento de combinación para su uso en la terapia de tumores sólidos, en particular, de tumores cerebrales, en particular, glioma, que comprende

- un polipéptido de IL-12, o un vector de expresión de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido de IL-12, y
- un ligando no agonista de CTLA-4

5 en donde el polipéptido de IL-12 o el vector de expresión de ácido nucleico, se proporciona mediante la administración en un tumor, en las proximidades de un tumor, o en el nódulo linfático asociado con un tumor.

10 En el contexto de la presente invención, un polipéptido de IL-12 es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de p35 (ID de Uniprot 29459, SEQ ID 05) o un homólogo funcional del mismo, y que comprende la secuencia de p40 (ID de Uniprot 29460, SEQ ID 06) o un homólogo funcional del mismo. En una realización, el polipéptido de IL-12 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende tanto secuencias de p35 como de p40 u homólogos de los mismos como parte de la misma cadena continua de aminoácidos. En otra

15 realización, el polipéptido de IL-12 comprende dos cadenas de aminoácidos diferentes, una que comprende la secuencia de p35 y la otra que comprende la secuencia de p40. La terminología "polipéptido de IL-12" no excluye la presencia de secuencias que no son de IL-12, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina y fragmentos de la misma, fusionadas con las secuencias de IL-12 descritas en el presente documento.

20 El polipéptido de IL-12 tiene una actividad biológica de IL-12. Una actividad biológica de IL-12 en el contexto de la presente invención es la estimulación de células NK o de linfocitos T por dicho polipéptido de IL-12, más notoriamente la estimulación de linfocitos T efectores que actúan a través de perforina.

25 En una realización del medicamento de combinación, dicho polipéptido de IL-12 comprende una secuencia de polipéptido al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de p35 humana (SEQ ID 05) y una secuencia de polipéptido al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de p40 humana (SEQ ID 06).

30 La identidad en el contexto de la presente invención es un único parámetro cuantitativo que representa el resultado de una comparación de secuencia posición por posición. Los métodos de comparación de secuencia son conocidos en la materia; el algoritmo BLAST públicamente disponible es un ejemplo.

35 En una realización, dicho polipéptido de IL-12 es una IL-12 humana recombinante. En una realización, dicho polipéptido de IL-12 es una IL-12 humana sintética. En una realización, dicho polipéptido de IL-12 es un péptido de fusión que comprende el fragmento cristizable (región Fc) de una inmunoglobulina humana. De acuerdo con una realización, el polipéptido IL-12 comprende un fragmento cristizable de inmunoglobulina G humana. Un fragmento cristizable en el contexto de la presente invención se refiere al segundo y tercer dominio constante de la molécula IgG. La región cristizable del fragmento (región Fc) es la región de la cola de un anticuerpo de inmunoglobulina que interactúa con los receptores de superficie celular (receptores Fc) y proteínas del sistema del complemento. En

40 isotipos de anticuerpo IgG, la región Fc está compuesta de dos fragmentos de proteína idénticos, que provienen del segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas de anticuerpo.

45 De acuerdo con una realización, el polipéptido IL-12 comprende un fragmento cristizable de inmunoglobulina humana G4. De acuerdo con una realización, el polipéptido de IL-12 tiene o comprende la secuencia de la SEQ ID 01. De acuerdo con otra realización, el polipéptido de IL-12 comprende una secuencia al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID 01.

50 Las realizaciones en las que las cadenas del polipéptido de IL-12 están fusionadas a fragmentos Fc de inmunoglobulina muestran diferentes comportamientos farmacocinéticos en comparación con la citocina recombinante, que para algunas aplicaciones puede conferir un beneficio.

55 En una realización, el componente del polipéptido de IL-12 del medicamento de combinación se proporciona como una forma de dosificación para la administración o el suministro local (intratumoral). Tal forma de dosificación para la administración local (intratumoral) puede ser una forma de liberación lenta o una forma de liberación prolongada, a partir de la cual se libera dicha IL-12 durante una serie de horas a semanas. En una realización, el componente del polipéptido de IL-12 del medicamento de combinación se administra por administración mejorada por convección (CED, del inglés *convection enhanced delivery*) o una variación de la misma, por ejemplo, el dispositivo mostrado en el documento US2011137289 (A1).

60 En una realización, el polipéptido de IL-12 se administra sistémicamente junto con el bloqueo sistémico de CTLA-4. La IL-12 recombinante heterodimérica (peprotech) aplicada sistémicamente junto con el bloqueo sistémico de CTLA-4 (i.p.) logró una mejora significativa en la supervivencia en comparación con cualquier agente administrado por sí mismo (véase la Fig. 11).

65 En el contexto de la presente invención, un ligando no agonista de CTLA-4 es una molécula que se une de manera selectiva a CTLA-4 en condiciones que prevalecen en la sangre periférica, sin desencadenar el efecto biológico de la interacción de CTLA-4 con cualquiera de los ligandos fisiológicos de CTLA-4, en particular, CD80 y/o CD86.

Un ligando no agonista de CTLA-4 en el sentido de la invención se refiere a una molécula que es capaz de unirse a CTLA-4 con una constante de disociación de al menos 10^{-7} M^{-1} , 10^{-8} M^{-1} o 10^{-9} M^{-1} y que inhibe la actividad biológica de su respectiva diana.

- 5 Un ligando no agonista del polipéptido puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula de tipo anticuerpo o un oligopéptido, cualquiera de los cuales se une a y por lo tanto inhibe CTLA-4.

10 Un fragmento de anticuerpo puede ser un dominio Fab o un dominio Fv de un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de cadena simple, que es una proteína de fusión que consiste en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo conectado mediante un enlazador peptídico. El inhibidor también puede ser un anticuerpo de dominio único, que consiste en un dominio variable aislado de una cadena pesada o ligera. Adicionalmente, un anticuerpo también puede ser un anticuerpo de cadena pesada que consiste solo en cadenas pesadas tales como los anticuerpos hallados en camélidos. Una molécula de tipo anticuerpo puede ser una proteína de repetición, tal como una proteína de repetición de ankyrina diseñada (Molecular Partners, Zurich).

15 Un oligopéptido de acuerdo con el aspecto anterior de la invención puede ser un péptido que proviene del sitio de reconocimiento de un ligando fisiológico de CTLA-4. Tal ligando de oligopéptido compite con el ligando fisiológico por la unión a CTLA-4.

20 En particular, un ligando no agonista de CTLA-4 no lleva a una actividad atenuada de linfocitos T cuando se une a CTLA-4 en la superficie de un linfocito T. En determinadas realizaciones, la expresión "ligando no agonista de CTLA-4" abarca tanto antagonistas de CTLA-4 como ligandos que son neutros ante la señalización de CTLA-4. En algunas realizaciones, los ligandos no agonistas de CTLA-4 usados en la presente invención son capaces, cuando se unen a CTLA-4, de bloquear de manera estérica la interacción de CTLA-4 con sus compañeros de unión CD80 y/o CD86.

25 En una realización, dicho ligando no agonista de CTLA-4 es una gamma inmunoglobulina que se une a CTLA-4, sin desencadenar la respuesta fisiológica de la interacción de CTLA-4 con sus compañeros de unión CD80 y/o CD86.

30 Los ejemplos no limitantes para un ligando de CTLA-4 son los anticuerpos aprobados clínicamente tremelimumab (CAS 745013-59-6) e ipilimumab (CAS N.º 477202-00-9; Yervoy).

35 El término "gamma inmunoglobulina" en este contexto pretende abarcar tanto moléculas de inmunoglobulinas completas como fragmentos funcionales de las mismas, en donde la función es la unión a CTLA-4, PD-1 o PD-L1 (PD-L2) tal como se describe anteriormente.

40 La terapia de combinación comprende dos formas de dosificación diferentes, en donde dicho polipéptido de IL-12 se proporciona como una forma de dosificación para la administración intratumoral o la administración local en las proximidades del tumor, y dicho ligando no agonista de CTLA-4 se proporciona como una forma de dosificación para la administración sistémica, particularmente mediante inyección intravenosa. Sin embargo, dicho ligando no agonista de CTLA-4 también se puede aplicar localmente del mismo modo que el polipéptido de IL-12. De acuerdo con otra realización, el polipéptido de IL-12 se aplica directamente al nódulo linfático que drena el tumor.

45 De acuerdo con otra realización, la terapia de combinación comprende una forma de dosificación mediante la cual dicho polipéptido de IL-12 se proporciona para la administración intracraneal, por ejemplo, mediante inyección.

50 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento de combinación tal como se expone anteriormente, para su uso en un método de terapia de una neoplasia maligna, en particular, lesiones de cáncer sólido. En una realización, la neoplasia maligna es glioma. En una realización, la neoplasia maligna es un tumor cerebral secundario (metástasis cerebral de una lesión neoplásica que se origina fuera del cerebro). En una realización, la enfermedad es glioblastoma multiforme. En una realización, la neoplasia maligna es meningioma. En una realización, la neoplasia maligna es melanoma. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de páncreas. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de pulmón. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de próstata. En una realización, la neoplasia maligna es cáncer de vejiga.

55 Las lesiones cancerosas son propensas a expandirse en el tejido próximo, así como en distintas localizaciones en el cuerpo, dependiendo de su origen. El 20-40 % de todos los cánceres desarrollan metástasis cerebral; entre ellos, el cáncer de mama y de piel (melanoma) son las fuentes más comunes de metástasis cerebral (Sofietti et al., J Neurol 249, 1357-1369 (2002)). De manera similar a los tumores cerebrales malignos primarios, las metástasis cerebrales tienen un pronóstico malo a pesar del tratamiento y son rápidamente letales. Los linfocitos T son la población de células efectoras cruciales para el rechazo del tumor mediado por IL-12 en el cerebro. El tratamiento de combinación de IL-12 junto con anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-PD-L2 se dirige especialmente a los linfocitos T para activarlos y repolarizarlos. Dado que la metástasis cerebral crece en el mismo compartimento inmunológico que los tumores cerebrales primarios, los pacientes que padecen tumores cerebrales secundarios también se benefician del tratamiento de combinación.

65 En una realización, el medicamento de combinación comprende un polipéptido de IL-12 que tiene una actividad

biológica de IL-12 proporcionada como una proteína de fusión que comprende el aminoácido de la p40 humana, la secuencia de aminoácidos de la p35 humana y el fragmento cristalizante de la IgG4 humana, formulando dicho polipéptido de IL-12 como una forma de dosificación para la administración intratumoral. De acuerdo con esta realización, el medicamento de combinación comprende adicionalmente una inmunoglobulina G generada contra

- 5 CTLA-4 como un ligando no agonista de CTLA-4 formulado como una forma de dosificación para administración sistémica. De acuerdo con esta realización, el medicamento de combinación se proporciona para el tratamiento de neoplasias malignas, en particular, de glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.
- 10 De acuerdo con una alternativa de la invención, una terapia de combinación comprende un vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 que codifica un polipéptido de IL-12 codificado que tiene una actividad biológica de IL-12 y un ligando no agonista de CTLA-4.

- 15 El ligando de CTLA-4 puede estar realizado por polipéptidos, en particular, por anticuerpos, tal como se expone anteriormente. Un ejemplo no limitante para un polipéptido de IL-12 codificado es un fragmento cristalizante de inmunoglobulina G fusionado a las cadenas de polipéptidos constituyentes de IL-12, IL-12 humana o un equivalente funcional de las mismas. Un ejemplo no limitante es una construcción de fusión que tiene los polipéptidos constituyentes de IL-12 enlazados por una secuencia de aminoácidos corta tal como se representa en la Fig. 1, cuya secuencia de aminoácidos se da como SEQ ID 01 y la secuencia codificante de ácido nucleico se da como SEQ ID
- 20 07.

La ventaja de usar proteínas de fusión de citocinas y el fragmento cristalizante de las inmunoglobulinas en lugar de la citocina recombinante es una farmacocinética mejorada (Belladonna et al. J Immunol 168, 5448-5454 (2002); Schmidt, Curr Opin Drug Discov Devel 12, 284-295 (2009); Eisenring et al., Nat Immunol 11, 1030-1038 (2010)).

- 25 El vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 de acuerdo con este aspecto de la invención puede, a modo de ejemplo no limitante, ser un plásmido de expresión de ADN "desnudo" que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de IL-12 bajo el control de una secuencia promotora operable en una célula tumoral humana, para la administración en el tumor, por ejemplo, mediante inyección intracraneal. El vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 puede ser de manera similar un vector vírico, por ejemplo, un virus adenoasociado, un adenovirus, un lentivirus o un virus herpes.
- 30

Tal vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 se puede proporcionar como una forma de dosificación para la administración intratumoral en combinación con un ligando proteico no agonista de CTLA-4 y/o un ligando no agonista de PD-1 tal como se expone anteriormente. De manera similar, el alcance de la presente invención abarca el uso de tal vector de expresión de ácido nucleico de IL-12, en combinación con un ligando no agonista de CTLA-4, en un método para preparar un medicamento de combinación para su uso en terapia de neoplasia maligna, en particular, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga. Asimismo, se proporciona un método para tratar a un paciente que padece de

35 neoplasia maligna, en particular, glioma u otro tumor de tejido sólido, que comprende la administración de un vector de expresión de ácido nucleico de IL-12 que tiene una actividad biológica de IL-12, y un ligando no agonista de CTLA-4 y/o un ligando no agonista de PD-1 para dicho paciente.

40

Breve descripción de las figuras

- 45 Fig. 1a muestra la estructura y secuencia de la proteína de fusión dada en la SEQ ID 01. Las subunidades p40 y p35 de IL-12 se representan como rectángulos. Estas subunidades se conectan mediante un enlazador (G₄S)₃. Las subunidades CH2, CH3 y los seis últimos aminoácidos de CH1 del fragmento cristalizante de la inmunoglobulina se muestran como círculos oblongos.
- 50 Fig. 1b muestra la proteína de fusión dada en la SEQ ID 01, la imagen de la izquierda muestra una inmunotransferencia usando condiciones reductoras, desarrollada con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano acoplado con HRP, la imagen de la derecha muestra una tinción de plata de la proteína de fusión en condiciones no reductoras (DTT -) y en condiciones reductoras (DTT+)
- 55 Fig. 1c muestra la producción de IFN-γ en monocitos de sangre periférica humana (PBMC) tal como se evalúa mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las células se estimularon bien con IL-12 humana recombinante heterodimérica comercialmente disponible (rhIL-12) o con la proteína de fusión purificada dada SEQ ID 01 (hIL-12Fc) en presencia de un anticuerpo dirigido contra CD3 (estimulación de linfocitos T policlonales). Sin estímulo: sin estimulación de IL-12 ni estimulación de anti-CD3 (control de valores iniciales). El experimento se realizó por triplicado, las barras de error denotan datos de e.e.m. representativos de tres experimentos independientes
- 60
- 65 Fig. 2 muestra la inmunohistoquímica de secciones tumorales fijadas con formalina obtenidas a partir de ratones singénicos C57/B16 5 semanas tras la exposición con 2x10⁴ células GI261 IL-12Fc o GI261 Fc y teñidas con anticuerpo contra F4/80, tinción de contraste de hematoxilina (ejemplos representativos, n=6 ratones

por grupo). La barra de escala indica 2 mm, la punta de la flecha indica el tumor residual GI261 IL-12Fc (SEQ ID 02).

Fig. 3 muestra la obtención de imágenes de bioluminiscencia no invasiva (BLI) de glioma de ratones en ratones C57/Bl6 singénicos (n = 5-6 ratones por grupo) tras la implantación de 2×10^4 células GI261 que expresan de manera constitutiva luciferasa de *photinuspyralis* y que libera una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (GI261 IL-12Fc, (SEQ ID 02)) o solo Fc como control (GI261 Fc). Panel superior: Cuantificación de crecimiento tumoral que se correlaciona con el flujo de fotones (f/s) en la región de interés (RDI) frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas. Panel inferior: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Fig. 4 muestra la obtención de imágenes de bioluminiscencia no invasiva (BLI) de glioma de ratones en animales de TS y diferentes ratones mutantes (n = 5-7 ratones por grupo) tras la implantación de 2×10^4 células GI261 que expresan de manera constitutiva luciferasa de *photinuspyralis* y que libera una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (GI261 IL-12Fc, (SEQ ID 02)). Panel superior: Cuantificación del crecimiento tumoral mediante obtención de imágenes por BLI frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas. Panel inferior: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. A) se implantaron GI261 IL-12Fc en ratones que carecen de linfocitos T y de linfocitos B (*Rag1*^{-/-}) o de células NK (*Il-5ra*^{-/-}) o que carecen tanto de linfocitos T como de linfocitos B y de células NK y de células de tipo inductor de tejido linfático (*Rag2*^{-/-} *Il2rg*^{-/-}). B) se implantaron GI261 IL-12Fc en ratones deficientes para el MHCII (*Ia(b)*^{-/-}) y el MHCI (*B2m*^{-/-}). (n=5-8 ratones/grupo), que carecen de linfocitos T CD4 o CD8 positivos, respectivamente. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Fig. 5 muestra la formación de linfocitos T de memoria en animales de ts supervivientes que se han expuesto previamente a células 2×10^4 GI261 IL-12Fc (SEQ ID 02). Se muestran los ejemplos de bioluminiscencia emitida a partir de los cerebros de animales de ts supervivientes que se han vuelto a exponer a células GI261 Fc en comparación con los animales de ts sin exposición previa (panel superior, días 1, 7 y 21 tras la reexposición). Además, se muestra la bioluminiscencia de los tumores en fotones por segundo (f/s) en la región de interés (RDI) frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas (panel inferior). Se observó un rechazo rápido de los tumores de control en los animales de ts supervivientes. Mientras que la luminiscencia medida el día 1 sugirió una metástasis idéntica en los dos grupos, solo los ratones sin exposición previa presentaron una señal medible el día 7 en adelante, lo que sugiere una respuesta de memoria anti-glioma de eliminación rápida y eficaz ahora independiente de citocinas proinflamatorias expresadas ectópicamente (es decir, IL-12Fc, (SEQ ID 02)). (n=4-6 ratones/grupo). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Fig. 6 muestra la obtención de imágenes de bioluminiscencia no invasiva (BLI) de glioma de ratones en diferentes ratones mutantes (n = 4-8 ratones por grupo) tras la implantación de 2×10^4 células GI261 Fc que expresan de manera constitutiva luciferasa de *photinuspyralis* y que libera una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (GI261 IL-12Fc (SEQ ID 02)). A) animales de ts (círculos blancos) y *IFN γ* ^{-/-} (círculos negros) B) animales de ts (círculos blancos) y *Perforina*^{-/-} (círculos negros). Se muestra la cuantificación de crecimiento tumoral que se correlaciona con el flujo de fotones (f/s) en la región de interés (RDI) frente a los días tras la inyección de las células de glioma modificadas (panel superior). Panel inferior: Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Fig. 7 muestra el crecimiento tumoral en ratones de ts inoculados con 2×10^4 células GI261 Fc. El tratamiento comenzó el día 21 (flechas). Se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran IL-12Fc (SEQ ID 02) (o PBS). Los animales recibieron inyecciones por vía i.p. de anticuerpos que bloquean α CTLA-4 o de PBS comenzando el día 22, seguido de inyecciones tal como se indica en la figura. Gráfico superior: cuantificación del flujo de protones en la RDI de animales de ts portadores de tumor que recibieron el tratamiento indicado. Gráfico inferior: análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales anteriores; PBS/PBS frente a IL-12Fc/ α CTLA-4 p=0,0045, PBS/PBS frente a IL-12Fc/PBS p=0,3435, PBS/ α CTLA4 frente a IL-12Fc/ α CTLA-4 p=0,0101; Test de Log-rank (Mantel-Cox). Datos representativos de tres experimentos independientes con 2-5 animales por grupo

Fig. 8 muestra la inmunohistoquímica de secciones tumorales obtenidas de ratones singénicos C57/Bl6 tras la exposición a células GI261 Fc el día 21 y tras la administración local de IL-12Fc (SEQ ID 02) en combinación con el bloqueo sistémico de CTLA-4 tal como se describe en el Ejemplo 5. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. La barra de escala indica 2 mm.

Fig. 9 muestra el crecimiento tumoral en ratones de ts inoculados con 2×10^4 células GI261 Fc. El tratamiento comenzó el día 21 (flechas). Se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran IL-12Fc (SEQ ID 02). Los animales recibieron inyecciones por vía i.p. de

anticuerpos que bloquean α PD-1 o anticuerpos de isotipo de control comenzando el día 22, seguido de inyecciones tal como se indica en la figura. Gráfico superior: cuantificación del flujo de protones en la RDI de animales de ts portadores de tumor que recibieron el tratamiento indicado. Gráfico inferior: análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales anteriores; PBS/isotipo frente a IL-12Fc/ α PD-1 $p=0,0064$, Test de Log-rank (Mantel-Cox). Datos representativos de un experimento con 5-6 animales por grupo.

Fig. 10 muestra el crecimiento en ratones de ts inoculados con células 50 B16-F10. El tratamiento comenzó el día 5 (flecha). Se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran IL-12Fc (SEQ ID 02). Los animales recibieron inyecciones por vía i.p. de anticuerpos que bloquean α CTLA-4 o de PBS comenzando el día 6, seguido de inyecciones tal como se indica en la figura. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier PBS/PBS frente a IL-12Fc/ α CTLA-4 $p=0,0028$, Test de Log-rank (Mantel-Cox). Datos representativos de un experimento con 6 animales por grupo.

Fig. 11 muestra la administración sistémica de IL-12 heterodimérica recombinante en combinación con el bloqueo de CTLA4. Se inyectaron 2×10^4 células GI261 Fc en el cuerpo estriado derecho de ratones de ts y se siguió el tumor durante 90 días. Tratamiento sistémico: en el día 21 (flecha), los animales portadores de tumor se trataron inicialmente con 20 μ g de IgG2b de ratón α CTLA-4 (9D9) (triángulos rellenos de gris claro, $n=8$), 200 ng de IL-12 heterodimérica recombinante (rIL-12) (triángulos rellenos de gris oscuro, $n=9$) o una combinación de ambos (triángulos rellenos de negro, $n=9$) por inyección intraperitoneal (i.p.). El grupo de control recibió solución salina tamponada con fosfato (PBS) (triángulos sin relleno, $n=7$). El tratamiento se mantuvo con 100 μ g de α CTLA-4 o 100 ng de rIL-12 o una combinación de ambos 3 veces / semana hasta el final del experimento. Gráfico superior: cuantificación del flujo de protones en la RDI de animales de ts portadores de tumor que recibieron el tratamiento indicado. Gráfico inferior: análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los animales anteriores; Se usó un test Log-rank (Mantel-Cox) para calcular los p-valores indicados; datos agrupados de dos experimentos independientes.

Ejemplos

Métodos

Animales

Los ratones C57BL/6 se obtuvieron de Janvier; los ratones $b2m^{-/-}$, $la(b)^{-/-}$, $Il2rb2^{-/-}$, $Rag1^{-/-}$, $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$, $Prf1^{-/-}$ e $lfrng^{-/-}$ se obtuvieron de Jackson Laboratories. Los ratones $Il5ra^{-/-}$ se proporcionaron por S. Bulfone-Paus. Todos los animales se mantuvieron enjaulados en condiciones específicas libres de patógenos con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y con comida y agua a voluntad. Todos los experimentos con animales se aprobaron por la oficina veterinaria cantonal de Suiza (16/2009).

Líneas de células tumorales de ratón

Las células de glioma de murino C57/BI6 (GI261) (generosamente proporcionadas por A. Fontana, Inmunología Experimental, Universidad de Zurich) se transfectaron con pGI3-ctrl (Promega) y pGK-Puro (generosamente proporcionadas por T. Buch, Universidad Técnica, Munich). Las construcciones linealizadas se electroporaron en una proporción de 10:1 usando un multiporador de eppendorf, después se seleccionaron con 0,8 μ g/ml de puomicina (Sigma-Aldrich) para generar células GI261 estables para luciferasa. Se aisló un único clon mediante dilución limitante y se pasó *in vivo* mediante inoculación de tumor intracraneal, seguido por la disociación del tumor tras 4 semanas y la reselección en 0,8 μ g/ml de puomicina. Posteriormente, Las células se electroporaron con pCEP4-mIgG3, pCEP4-mIL-12mIgG3 (SEQ ID 09) y pCEP4-mIL-23mIgG3 (SEQ ID 08) (Eisenring et al, 2010) y se seleccionó la carga con 0,8 μ g/ml de puomicina y 0,23 mg/ml de higromicina (Sigma-Aldrich). La producción de citocina se detectó mediante ELISA (OptEIA IL-12/23p40, BD Pharmingen) y rt-PCR (IgG3fw: ACACACAGCCTGGACGC (SEQ ID 03) IgG3rev: CATTTGAACTCCTTGCCCCCT (SEQ ID 04)). las células GI261 y las líneas celulares derivadas se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco, Invitrogen) complementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS, del inglés *fetal calf serum*) en presencia de antibióticos de selección tal como se indica anteriormente a 37 °C y CO₂ al 10 %. Las células de melanoma murino B16-F10 se obtuvieron de ATCC.

Expresión y purificación de IL-12Fc

La IL-12Fc (SEQ ID 02) se expresó en células 293T tras la transfección mediada por fosfato de calcio de acuerdo con los protocolos estándar con 45 μ g de ADN vectorial (pCEP4-mIL-12IgG3, SEQ ID 09)/placa de cultivo tisular de 15 cm. El sobrenadante se recolectó 3 días y 6 días tras la transfección, se hizo un filtrado estéril y se diluyó a 1:1 en PBS. La proteína se purificó usando un purificador (ÄktaPrime) sobre una columna de proteína G (1 ml, HiTrap, GE Healthcare) eluida con 0,1 M de glicina a pH 2 y se dializó toda la noche en PBS a pH 7,4. La concentración y la pureza de IL-12Fc (SEQ ID 02) se midió mediante ELISA (OptEIA IL-12/23p40, BD Pharmingen) y SDS-PAGE seguido por tinción de plata e inmunotransferencia. La IL-12Fc se detectó con un anticuerpo anti-IL12p40 de ratón en rata (C17.8, BioExpress) y un anticuerpo anti-rata en cabra acoplado a HRP (Jackson). Se usó el mismo

procedimiento para la expresión de IL-12Fc humana (SEQ ID 01,07).

Caracterización de IL-12Fc humana

- 5 La concentración y la pureza de la IL-12Fc humana (SEQ ID 01) se midió mediante ELISA (IL-12 (p70) humana, Mabtech, n.º 2455-1H-6) y SDS-PAGE seguido por tinción de plata e inmunotransferencia. El marcador de IgG4 humana se detectó con un anticuerpo anti-IgG humana en cabra acoplado a HRP (n.º A0170, Sigma). Para la caracterización funcional de la IL-12Fc (SEQ ID 01), las PBMC, adquiridas de acuerdo con las directrices éticas de la Universidad de Zurich, se colocaron en placas a 100.000 células por pocillo en medio RPMI complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 % en placas de 96 pocillos y se estimularon bien con IL-12 humana recombinante (Peprotech) o IL-12Fc humana (SEQ ID 01). Ambas citocinas se normalizaron entre sí de acuerdo con las concentraciones derivadas del ELISA de IL-12p70 humana (Mabtech, n.º 2455-1H-6). Las PBMC se estimularon en presencia de 1 µg/ml de un anticuerpo de IgG2a anti-CD3 humano en ratón (OKT3, Bio-X-cell). Tras dos días de cultivo en CO₂ al 5 % y a 37 °C, el sobrenadante se cultivó y se sometió a un ELISA de anti-IFN-γ humano (Mabtech, n.º 3420-1H-6).

Inoculación de glioma ortotópico

- 20 En resumen, los ratones de 6-10 semanas de edad se inyectaron por vía i.p. con Flunixin (Biokema, 5 mg/kg de peso corporal) antes de anestesiarnos con isoflurano al 3-5 % (Minrad) en una cámara de inducción. Se afeitaron sus cabezas con una maquinilla eléctrica. Tras montarlos en un marco estereotáctico (David Kopf instruments), se desinfectó el cuero cabelludo de los animales con solución de yodo al 10 % y se realizó una incisión en la piel a lo largo de la línea media. La anestesia en el marco estereotáctico se mantuvo al 3 % de isoflurano administrada a través de un adaptador nasal (David Kopf Instruments). Posteriormente, se montó una jeringa de extremo romo (Hamilton, 75N, 26s/2"2, 5µl) sobre una bomba de microinyección sobre el brazo manipulador y se colocó a 1,5 mm lateral y a 1 mm frontal del bregma. La aguja se bajó al orificio de la fresa perforado manualmente a una profundidad de 4 mm por debajo de la superficie de la duramadre y se retrajo 1 mm para formar un pequeño reservorio. Usando la bomba de microinyección (UMP-3, World Precision Instruments Inc.) se inyectaron 2x10⁴ células en un volumen de 2 µl a 1 µl/min. Tras dejar la aguja en el lugar durante 2 minutos, se retrajo a 1 mm/min. El orificio de la fresa se cerró con cera para huesos (Aesculap, Braun) y la herida del cuero cabelludo se selló con adhesivo tisular (Indermil, Henkel).

Obtención de imágenes bioluminiscentes in vivo

- 35 Los ratones que portan el tumor se pesaron cuidadosamente, se anestesiaron con isoflurano (2-3 %) y se inyectaron con D-Luciferina (150 mg/kg de peso corporal, CaliperLifesciences). Los animales se transfirieron a la cámara oscura de un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS 100 (CaliperLifesciences), la anestesia se mantuvo al 2 % de isoflurano a través de conos nasales. La luminiscencia se registró 10 minutos después de la inyección. Los datos se analizaron posteriormente usando el programa informático Living Image 2.5 (CaliperLifesciences). Una región circular de interés (RDI; 1,46cm Ø) se definió alrededor de la cabeza de los animales y el flujo de protones de esta región se leyó y se representó gráficamente.

Tratamiento de los gliomas establecidos

- 45 El d21 tras la implantación de las células de glioma, los animales que portan el tumor se distribuyeron de manera uniforme entre los grupos experimentales basándose en su flujo de fotones en RDI. Los animales con un flujo en la RDI de menos de 1x10⁵ f/s se consideraron como no aceptores y se excluyeron. 40-48 horas antes de la implantación (2 días antes del comienzo del tratamiento), las bombas osmóticas (Modelo 2004, 0,25 µl/h; Alzet) se rellenaron con IL-12Fc de murino (SEQ ID 02, 8,33 ng/µl en PBS) o solo PBS y se cebaron a 37 °C en PBS. Inmediatamente antes de la cirugía, se inyectó a los ratones con Flunixin por vía i.p. (Biokema, 5 mg/kg de peso corporal). Se anestesió a los ratones con isoflurano al 3-5 %, se desinfectó el cuerpo cabelludo y se realizó una incisión en la línea media. Se localizó el orificio de la fresa anterior de la inyección de glioma, se retiró la cera para hueso y el periostio y se colocó la bomba en una bolsa de piel formada en la espalda del animal. La cánula de infusión se bajó a través del orificio de la fresa 3 mm hacia el centro putativo del tumor. La cánula se conectó a la bomba (kit de infusión cerebral III 1-3 mm, Alzet) mediante un tubo de silicona y se mantuvo en su lugar con adhesivo de cianoacrilato. La piel se suturó con un hilo de nylon 4-0. Después de la cirugía, los ratones se trataron durante 3 días con Borgal al 0,1 % (v/v) (Intervet) en el agua que bebían. Las bombas se explantaron el día 49. Se inyectaron por vía i.p. cinco dosis de anticuerpos de IgG2b de ratón anti-CTLA-4 de ratón (clon 9D9, bio-X-cell; Peggs et al.; J Exp Med 206, 1717-1725 (2009)) o un volumen equivalente de PBS los días 22 (200 µg), 26 (100 µg), 29 (100 µg), 35 (100 µg) y 42 (100 µg).

- 65 Como alternativa, los animales recibieron IgG2a de rata anti-PD-1 de ratón (clon RMP1-14, bio-X-cell) o anticuerpos de control de isotipo IgG2a de rata (clon 2A3, bio-X-cell) para el experimento representado en la figura 9. Las pautas de dosificación y la vía de aplicación fue idéntica con el experimento representado en la figura 7. Para el tratamiento de tumores cerebrales derivados de B16-F10, se implantaron las bombas el día 5 tras la inyección, se inyectaron por vía i.p. anticuerpos IgG2b de ratón anti-CTLA-4 de ratón (clon 9D9, bio-X-cell; Peggs et al.; J Exp Med 206, 1717-

1725 (2009)) o un volumen equivalente de PBS en los días 6 (200 µg), 11 (100 µg), 13 (100 µg) y 19 (100 µg).

Análisis de supervivencia de los animales portadores de tumores

- 5 Los animales que portaban tumores se controlaron mediante BLI, se revisaron los síntomas neurológicos y se pesaron semanalmente hasta el día 21 tras la inoculación de glioma. Los animales de GI261 Fc que presentaron un flujo en la RDI de menos de 1×10^5 f/s en el día 21 se consideraron como no aceptores o aceptores lentos del tumor y se excluyeron del análisis de supervivencia (5-10 %). Desde el día 21 en adelante, los animales se revisaron diariamente. Los animales que presentaban síntomas tales como apatía, una postura encorvada grave y/o pérdida de peso de más del 20 % del peso máximo se sacrificaron. Los ratones que portaban el tumor B16-F10 se puntuaron diariamente comenzando desde el día 5 hasta el final del experimento de acuerdo con el mismo esquema.

Histología

- 15 Para la histología, los animales se sacrificaron con CO₂, se perfundieron por vía transcardíaca con PBS enfriado en hielo y se decapitaron. Se aislaron cuidadosamente los cerebros completos, se fijaron en formalina al 4 %, se embebieron en parafina y se generaron secciones de 3 µm para la tinción de HE y/o inmunohistoquímica para detectar F4/80 (BM8; BMA biomedical). Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa de rábano picante. La tinción se visualizó con 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) como sustrato de HRP. Las imágenes se generaron usando un microscopio de luz Olympus BX41 equipado con una cámara Olympus ColorViewIIIu y un programa informático de adquisición de imágenes Olympus cell^B. Las vistas generales de las secciones de cerebros completos se recortaron usando Adobe Photoshop CS3.

Análisis estadístico

- 25 Para el análisis estadístico de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, se usó un test Log-rank (Mantel-Cox) para calcular los p-valores indicados en las respectivas figuras. Los p-valores de menos de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis se realizó con GraphPad Prism versión 5.0a para Mac OSX (GraphPad Software Inc).

Ejemplo 1: La expresión intratumoral de IL-12Fc promueve la eliminación de los gliomas experimentales

- Los presentes inventores han diseñado y clonado una proteína de fusión que consiste en la subunidad p40 de la IL-12 humana unida mediante un enlazador peptídico flexible a la subunidad p35. Esta construcción de cadena simple se fusionó entonces a la región constante de la cadena pesada de la IgG4. (Fig. 1A). Los presentes inventores denominaron esta proteína de fusión de cadena simple humana IL-12Fc (SEQ ID 01). Los presentes inventores expresaron esta proteína en células embrionarias de riñón humano HEK293 y detectaron una forma dímera así como una forma monómera en condiciones naturales. En condiciones reductoras solo se detectó la forma monómera (Fig. 1B). La IL-12Fc (SEQ ID 01) tiene propiedades funcionales similares a la IL-12 heterodímera comercialmente disponible (obtenido de Peprotech). Para determinar si la IL-12Fc (SEQ ID 01) podría ser adecuada para superar el entorno inmunosupresor local inducido por gliomas y para arrojar luz sobre los mecanismos efectores implicados, los inventores expresaron una versión de murino (Belladonna et al. J Immunol 168, 5448-5454 (2002), IL-12Fc (SEQ ID 02)) de esta citocina en células GI261 de glioma de ratón. Para medir el crecimiento tumoral intracraneal de manera no invasiva mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI, del inglés *bioluminescence imaging*), los presentes inventores generaron en primer lugar una línea de GI261 que expresa de manera constitutiva luciferasa de *Photinus pyralis*. Los presentes inventores denominaron a esta línea celular GI261-luc. A continuación, los presentes inventores modificaron esta línea celular para liberar de manera continua una proteína de fusión de IL-12 y el fragmento cristizable de inmunoglobulina G3 de ratón (IL-12Fc; SEQ ID 02, 09) o Fc (SEQ ID 08) solo como un control (denominados 'GI261 IL-12Fc' y 'GI261 Fc', respectivamente). La secuencia de proteína de murino elegida de la construcción de fusión es homóloga a la variante humana (SEQ ID 01) y consiste en las subunidades p40 y p35 de la IL-12 que están conectadas a través de un enlazador (G4S)₃ y las subunidades CH2, CH3 y los seis últimos aminoácidos de CH1 de IgG3, mientras que CH1 y CH2 están conectadas por una región bisagra. Los vectores para la expresión del fragmento de control y la construcción de fusión de IL-12 se representan en la SEQ ID 08 y 09, respectivamente. La intención de usar proteínas de fusión en lugar de la citocina recombinante fue ver si presentarían una farmacocinética mejorada. Los presentes inventores confirmaron la secreción de IL-12Fc (SEQ ID 02) mediante ELISA para las subunidades p40 y p70. Los presentes inventores confirmaron adicionalmente la expresión de la cola Fc mediante RT-PCR. Cuando se implantó por vía intracraneal en el cuerpo estriado derecho, las lecturas de bioluminiscencia y el volumen tumoral tal como se evalúan mediante métodos estereológicos presentaron una fuerte correlación (datos no mostrados).

- 60 A continuación, los presentes inventores implantaron GI261 IL-12Fc y Fc en el cuerpo estriado derecho de ratones C57Bl/6 y tras el crecimiento tumoral a través de obtención no invasiva de imágenes por bioluminiscencia (BLI). Tras un aumento inicial en la luminiscencia, todos los grupos presentaron una bajada alrededor del día 14 tras la inyección. Los animales que portan tumores que expresan Fc presentaron un fuerte aumento en BLI y pronto alcanzaron los criterios de exclusión, a veces incluso antes del día 35 tras la inyección. En contraste, las lecturas de BLI para animales que se habían inyectado con tumores de GI261 que expresa IL-12Fc cayeron a niveles cerca del

límite de detección en el día 21 en adelante (datos no mostrados). De acuerdo con esta observación, los presentes inventores solo pudieron detectar un tumor residual en algunos animales en este grupo, mientras que los animales inyectados con Fc de control presentaron una fuerte formación de tumor cuando se analizaron histológicamente (Fig. 2). Cuando los presentes inventores siguieron animales a los que habían implantado células GI261 IL-12Fc o GI261 Fc durante hasta 90 días, los presentes inventores observaron rechazo del tumor en una alta proporción de ratones que llevan tumores que secretan IL-12Fc tras un establecimiento inicial (Fig. 3).

Ejemplo 2: Los linfocitos T son el tipo principal de células efectoras del rechazo de glioma mediado por IL-12Fc.

Para confirmar que la secreción de IL-12Fc por GI261 IL-12Fc actúa sobre el hospedador en lugar de en las propias células tumorales, los presentes inventores observaron que el crecimiento de GI261 IL-12Fc y GI261 Fc es el mismo en ratones que carecen del receptor para IL-12. El crecimiento desenfrenado de GI261 IL-12 en animales *IL-12rβ2^{-/-}* demuestra que IL-12Fc actúa específicamente sobre un tipo celular en el ratón receptor (datos no mostrados). Los linfocitos T y las células NK están entre los leucocitos más sensibles a IL-12. Para ensayar de manera sistemática la relevancia funcional del influjo mediado por IL-12Fc de estas células, los presentes inventores expusieron a una serie de ratones mutantes a GI261 IL-12Fc intracraneal. Los presentes inventores implantaron células GI261 IL-12Fc en ratones que carecen de linfocitos T y de linfocitos B (*Rag1^{-/-}*) o de células NK convencionales (*IL-15ra^{-/-}*) o en ratones que carecen tanto de linfocitos T como de linfocitos B, de células NK y de células de tipo inductor de tejido linfoide (*Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}*) (Fig. 4A). Tras una fase de retraso inicial hasta el día 14 tras la inyección, todos los grupos presentaron un fuerte aumento en luminiscencia hasta el día 28, reflejando un fuerte crecimiento tumoral. Entre los días 28 y 42, la mayoría de los animales sucumbieron a los tumores. Solo los ratones de ts y *IL-15ra^{-/-}* fueron capaces de controlar el tumor y presentaron una supervivencia prolongada en comparación con los animales *Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}* y *Rag1^{-/-}*. Aunque los linfocitos T o los linfocitos B parecieron ser cruciales para el rechazo de glioma mediado por IL-12Fc, la capacidad de los ratones *IL-15ra^{-/-}* para rechazar GI261 IL-12 indica que las células NK eran en gran medida prescindibles.

A continuación, los presentes inventores investigaron la contribución de los linfocitos T CD4 y CD8 positivos usando ratones deficientes en el MHCII (*Ia(b)^{-/-}*) y en el MHCI (*β2m^{-/-}*). Al contrario que los ratones de ts, los ratones *Ia(b)^{-/-}* que carecen de linfocitos T CD4 no pudieron controlar los tumores GI261 IL-12Fc, y los ratones *β2m^{-/-}* sucumbieron al glioma poco después (Fig. 4B). La supervivencia en ambos grupos mutantes se acortó en comparación con el grupo de tipo silvestre. Estos datos demuestran claramente que el rechazo del tumor mediado por IL-12Fc depende de la actividad de los linfocitos T, incluyendo los linfocitos T colaboradores y los CTL.

Ejemplo 3: La respuesta de memoria antitumoral es independiente de IL-12Fc expresado ectópicamente.

Para investigar adicionalmente el carácter del control tumoral dependiente de linfocitos T, los presentes inventores probaron a los animales de ts supervivientes que se habían expuesto previamente a células GI261 IL-12Fc para la formación de linfocitos T de memoria (Fig. 5). Los animales se trataron tal como se describe en la Fig. 3 / ejemplo 1. Al contrario de la exposición primaria, los presentes inventores inyectaron en este caso células GI261 Fc en el hemisferio contralateral de los animales de supervivientes o de los ts sin exposición previa. Los presentes inventores observaron un rechazo rápido de los tumores de control en días. Mientras que la luminiscencia medida el día 1 sugirió una metástasis idéntica en los dos grupos, solo los ratones sin exposición previa presentaron una señal medible el día 7 en adelante, lo que sugiere una respuesta de memoria anti-glioma de eliminación rápida y eficaz ahora independiente de citocinas proinflamatorias expresadas ectópicamente.

Ejemplo 4: Los CTL son las principales células efectoras del rechazo de glioma mediado por IL-12Fc.

Está bien establecido que la IL-12 polariza los linfocitos T sin exposición previa para adoptar un fenotipo de T_H1 (Trinchieri, Nat Rev Immunol 3, 133-146 (2003)). Para arrojar más luz a los fundamentos mecánicos que subyacen al rechazo inducido por IL-12 de glioma experimental, los presentes inventores expusieron ratones deficientes en la citocina IFN-γ distintiva de T_H1 (*Ifng^{-/-}*) con células GI261 que expresan IL-12Fc (Fig. 6A). Los animales se trataron tal como se describe en la Fig. 3/ Ejemplo 1. Para su sorpresa, los presentes inventores observaron un rechazo tumoral similar al de animales de ts, lo que sugiere que el mecanismo de rechazo es independiente de IFN-γ. Por el contrario, IL-12 también estimula la actividad citotóxica de los CTL. Cuando los presentes inventores analizaron el papel de la perforina, una molécula citolítica expresada principalmente en los CTL $CD8^+$ y en células NK, los presentes inventores observaron una clara diferencia en las curvas de supervivencia. (Fig. 6B). La perforina es una molécula citolítica que se expresa principalmente por los CTL $CD8^+$ y por las células NK, pero también por los linfocitos T $CD4^+$. Para investigar adicionalmente el mecanismo de rechazo de glioma inducido por IL-12Fc, se expusieron ratones deficientes en perforina (*prf1^{-/-}*) con células GI261 que expresan IL-12Fc. Al contrario de *Ifng^{-/-}*, los animales deficientes en perforina (*prf1^{-/-}*) no fueron capaces de controlar el tumor. Esto sostiene la noción de que los CTL son las principales células efectoras del rechazo de glioma mediado por IL-12Fc. Se observó una clara diferencia en las curvas de supervivencia del ts y de *prf1^{-/-}*.

Ejemplo 5: La administración local de IL-12Fc en combinación con el bloqueo sistémico de CTLA-4 es eficaz contra los gliomas experimentales de etapa avanzada.

Para reforzar adicionalmente y prolongar el fenotipo activado de los linfocitos T, los presentes inventores bloquearon la molécula coinhibidora CTLA-4 mediante anticuerpos neutralizantes en el siguiente conjunto de experimentos. La IL-12 se administró localmente a ratones con tumores en etapas avanzadas. Se administró el tratamiento a animales que se habían expuesto a GI261 Fc 21 días antes y que ya presentaban fuertes señales de bioluminiscencia, lo que indica una etapa avanzada de crecimiento de glioma. Tratamiento local: En el día 21, se implantaron en los animales portadores de glioma las minibombas osmóticas que administran 50 ng de IL-12Fc/día (o PBS). Tras 28 días (día 49 tras la inyección tumoral) se explantaron las bombas vacías de los animales que sobrevivieron. Tratamiento sistémico: En el día 22, los animales portadores de tumor recibieron por vía i.p. 200 µg de IgG2b de ratón αCTLA-4 (9D9) o PBS. El tratamiento se mantuvo con 100 µg de αCTLA-4 los días 26, 29, 35 y 42 (Fig. 7). Ni IL-12Fc ni el anti-CTLA-4 solos confirieron ninguna ventaja significativa en la supervivencia. Increíblemente, la combinación de la administración local de IL-12Fc directamente en el sitio del tumor en combinación con el bloqueo sistémico de CTLA-4 llevó a una remisión completa del tumor (Fig. 8). 90 días tras la inoculación, la evaluación histológica del tejido cerebral de los animales que sobrevivieron no mostró ningún signo de desmielinización o infiltrados. La administración local de IL-12Fc en combinación con el bloqueo sistémico de PD-1 también llevó a un aumento significativo en los animales que sobrevivieron, la frecuencia, sin embargo, fue menor que con el bloqueo sistémico de CTLA-4 (Fig. 9). La terapia de combinación descrita anteriormente (Fig. 7) confiere una ventaja significativa en la supervivencia incluso en el caso de crecimiento intracraneal de células de melanoma murino singénico B16-F10 (Fig. 10). Este no es un modelo perfecto para tumores cerebrales secundarios dado que se salta diversas etapas de formación de metástasis. Incluso en esta situación más agresiva, el tratamiento de combinación prolonga la supervivencia.

El tratamiento preventivo de tumores en modelos preclínicos puede permitir el estudio de mecanismos inmunológicos y las interacciones entre células tumorales y el microentorno del tumor. Sin embargo, la terapia preventiva es de relevancia clínica limitada en la traducción para tratar pacientes con cáncer. Por lo tanto, los presentes inventores decidieron elegir un punto temporal excepcionalmente tardío para la intervención en un modelo de enfermedad progresiva y agresiva. Para imitar de cerca una situación clínica, los presentes inventores permitieron que el tumor progresase hasta un tamaño que es altamente probable que cause síntomas neurológicos en seres humanos. En el presente caso, la monoterapia con IL-12 aplicada localmente (intratumoral) tuvo un efecto de supervivencia mínimo aunque significativo. Los presentes inventores ya observaron un efecto sinérgico débil cuando combinaron el tratamiento sistémico de IL-12 con el bloqueo sistémico de CTLA-4. Cuando la infusión local de IL-12 se combinó con el bloqueo sistémico de CTLA-4, el efecto anti-glioma fue sorprendente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitaet Zuerich

<120> Medicamento de combinación que comprende IL-12 y un agente para el bloqueo de moléculas inhibidoras de linfocitos T para terapia tumoral

<130> uz117wo

<160>9

<170> PatentIn versión 3.5

<210>1

<211>775

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> fusión entre la IL-12 humana e IgG4 Fc

<400> 1

ES 2 671 728 T3

Met	Cys	His	Gln	Gln	Leu	Val	Ile	Ser	Trp	Phe	Ser	Leu	Val	Phe	Leu	1	5	10	15
Ala	Ser	Pro	Leu	Val	Ala	Ile	Trp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr	Val	20	25	30	
Val	Glu	Leu	Asp	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu	35	40	45	
Thr	Cys	Asp	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp	Thr	Leu	Asp	Gln	50	55	60	
Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	65	70	75	80
Glu	Phe	Gly	Asp	Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	85	90	95	
Leu	Ser	His	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	100	105	110	
Ser	Thr	Asp	Ile	Leu	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	115	120	125	
Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	130	135	140	
Leu	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	145	150	155	160

ES 2 671 728 T3

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
 165 170 175
 Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
 180 185 190
 Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
 195 200 205
 Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
 210 215 220
 Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
 225 230 235 240
 Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255
 Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270
 Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285
 Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300
 Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320
 Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp
 340 345 350
 Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala
 355 360 365
 Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro
 370 375 380
 Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr
 385 390 395 400
 Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser
 405 410 415

ES 2 671 728 T3

Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu
 420 425 430
 Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile
 435 440 445
 Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala
 450 455 460
 Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met
 465 470 475 480
 Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu
 485 490 495
 Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr
 500 505 510
 Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val
 515 520 525
 Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Lys Val Asp Lys
 530 535 540
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 545 550 555 560
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 565 570 575
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 580 585 590
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 595 600 605
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 610 615 620
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 625 630 635 640
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 645 650 655
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 660 665 670

ES 2 671 728 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Pro Glu Glu Met Thr Lys
675 680 685

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
690 695 700

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
705 710 715 720

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
725 730 735

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
740 745 750

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
755 760 765

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
770 775

<210>2

<211>781

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción de fusión de IL-12 IgG3 Fc de murino

<400> 2

Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
50 55 60

Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
85 90 95

ES 2 671 728 T3

Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp
 100 105 110
 Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys
 115 120 125
 Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
 130 135 140
 Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
 165 170 175
 Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
 180 185 190
 Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
 195 200 205
 Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser
 210 215 220
 Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro
 245 250 255
 Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val
 260 265 270
 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys
 275 280 285
 Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln
 290 295 300
 Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser Gly
 325 330 335
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val
 340 345 350

ES 2 671 728 T3

Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg Cys Leu Ser Gln Ser Arg Asn Leu
355 360 365

Leu Lys Thr Thr Asp Asp Met Val Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys
370 375 380

His Tyr Ser Cys Thr Ala Glu Asp Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg
385 390 395 400

Asp Gln Thr Ser Thr Leu Lys Thr Cys Leu Pro Leu Glu Leu His Lys
405 410 415

Asn Glu Ser Cys Leu Ala Thr Arg Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly
420 425 430

Ser Cys Leu Pro Pro Gln Lys Thr Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu
435 440 445

Gly Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala
450 455 460

Ile Asn Ala Ala Leu Gln Asn His Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp
465 470 475 480

Lys Gly Met Leu Val Ala Ile Asp Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn His
485 490 495

Asn Gly Glu Thr Leu Arg Gln Lys Pro Pro Val Gly Glu Ala Asp Pro
500 505 510

Tyr Arg Val Lys Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Ser Thr
515 520 525

Arg Val Val Thr Ile Asn Arg Val Met Gly Tyr Leu Ser Ser Ala Leu
530 535 540

Ile Lys Arg Ile Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly
545 550 555 560

Ser Ser Cys Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
565 570 575

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys
580 585 590

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His

ES 2 671 728 T3

595	600	605
Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr Gln		
610	615	620
Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu		
625	630	635 640
Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys		
	645	650 655
Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys		
	660	665 670
Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro		
	675	680 685
Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr		
	690	695 700
Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu		
705	710	715 720
Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly		
	725	730 735
Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu		
	740	745 750
Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn		
	755	760 765
His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys		
	770	775 780

- 5 <210>3
 <211>17
 <212> ADN
 <213> artificial
- 10 <220>
 <223> cebador de PCR
- <400> 3
 acacacagcc tggacgc 17
- 15 <210>4
 <211>20
 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador de PCR

5

<400> 4

catttgaact ccttgccct 20

<210>5

10

<211>219

<212> PRT <213> homo sapiens

<400> 5

Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
35 40 45

Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
50 55 60

Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
65 70 75 80

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
85 90 95

Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
100 105 110

Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
115 120 125

Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
130 135 140

Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
145 150 155 160

Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
165 170 175

Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
180 185 190

15

ES 2 671 728 T3

Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
195 200 205

Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
210 215

<210>6
<211>328
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

5

ES 2 671 728 T3

Met 1	Cys	His	Gln	Gln 5	Leu	Val	Ile	Ser	Trp 10	Phe	Ser	Leu	Val	Phe 15	Leu
Ala	Ser	Pro	Leu 20	Val	Ala	Ile	Trp	Glu 25	Leu	Lys	Lys	Asp	Val 30	Tyr	Val
Val	Glu	Leu 35	Asp	Trp	Tyr	Pro	Asp 40	Ala	Pro	Gly	Glu	Met 45	Val	Val	Leu
Thr	Cys 50	Asp	Thr	Pro	Glu	Glu 55	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp 60	Thr	Leu	Asp	Gln
Ser 65	Ser	Glu	Val	Leu	Gly 70	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu 75	Thr	Ile	Gln	Val	Lys 80
Glu	Phe	Gly	Asp	Ala 85	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys 90	His	Lys	Gly	Gly	Glu 95	Val
Leu	Ser	His	Ser 100	Leu	Leu	Leu	Leu	His 105	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly 110	Ile	Trp
Ser	Thr	Asp 115	Ile	Leu	Lys	Asp	Gln 120	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn 125	Lys	Thr	Phe
Leu	Arg 130	Cys	Glu	Ala	Lys	Asn 135	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe 140	Thr	Cys	Trp	Trp
Leu 145	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr 150	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser 155	Val	Lys	Ser	Ser	Arg 160
Gly	Ser	Ser	Asp	Pro 165	Gln	Gly	Val	Thr	Cys 170	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu 175	Ser
Ala	Glu	Arg 180	Val	Arg	Gly	Asp	Asn 185	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser 190	Val	Glu

ES 2 671 728 T3

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

<210>7

<211>2328

5 <212> ADN <213> artificial

<220>

<223> construcción de expresión, secuencia codificante para la proteína de fusión IL-12 IgG4 Fc

10 <400> 7

ES 2 671 728 T3

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttcctgg tttttctggc atctccctc	60
gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat	120
gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg tatcacctgg	180
accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa	240
gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg	300
ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag	360
aaagaacca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc	420
acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga	480
ggctcttctg accccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc	540

ES 2 671 728 T3

agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgcccc	600
gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat	660
gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgacct acccaagaac	720
ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtacctgac	780
acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag	840
agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc	900
cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttgagc	960
gaatgggcat ctgtgccctg cagtggaggc ggtggctcgg gcggtgggtg gtcgggtggc	1020
ggcggatcca gaaacctccc cgtggccact ccagaccag gaatgttccc atgccttcac	1080
cactcccaaa acctgctgag ggccgtcagc aacatgctcc agaaggccag acaactcta	1140
gaattttacc cttgcacttc tgaagagatt gatcatgaag atatcacaaa agataaaacc	1200
agcacagtgg aggcctgttt accattggaa ttaaccaaga atgagagttg cctaaattcc	1260
agagagacct ctttcataac taatgggagt tgcctggcct ccagaaagac ctcttttatg	1320
atggccctgt gccttagtag tatttatgaa gacttgaaga tgtaccaggt ggagttcaag	1380
accatgaatg caaagcttct gatggatcct aagaggcaga tctttctaga tcaaaacatg	1440
ctggcagtta ttgatgagct gatgcaggcc ctgaatttca acagtgagac tgtgccacaa	1500
aaatcctccc ttgaagaacc ggatttttat aaaactaaaa tcaagctctg catacttctt	1560
catgctttca gaattcgggc agtgactatt gatagagtga tgagctatct gaatgcttcc	1620
aaggtggaca agagagttga gtccaaatat ggtcccccat gccatcatg ccagcacct	1680
gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg tccccccaa aacccaagga cactctcatg	1740
atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccagga agaccccgag	1800
gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	1860
gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	1920
tggtgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc	1980
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagagc cacaggtgta caccctgcc	2040
ccatccccgg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc	2100
taccccgagc acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag	2160
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg	2220
gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg	2280
cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg gtaaata	2328

<210>8
 <211>10994
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>

<223> vector de plásmido que codifica el marcador de Fc (murino)

<400> 8

5

```

ctcgcagcaa agcaagatgt gtcctcagaa gctaaccatc tcttggtttg ccatcgtttt      60
gctgggtgtct ccactcatgg ccatgtggga gctggagaag cttatcaaga gaatcgagcc      120
tagaataccc aagcccagta cccccccagg ttcttcatgc ccacctggta acatcttggg      180
tggaaccatcc gtcttcatct tcccccaaaa gcccaaggat gcaactcatga tctccctaac      240
ccccaagggtt acgtgtgtgg tgggtggatgt gagcgaggat gaccagatg tccatgtcag      300
ctggtttgtg gacaacaaag aagtacacac agcctggacg cagccccgtg aagctcagta      360
caacagtacc ttccgagtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact ggatgagggg      420
caaggagtgc aaatgcaagg tcaacaacaa agccctccca gcccctatcg agagaacat      480
ctcaaaaccc aaaggaagag ccgagacacc tcaagtatac accatacccc cacctcgtga      540
acaaatgtcc aagaagaagg ttagtctgac ctgcctggtc accaacttct tctctgaagc      600
catcagtgtg gagtgggaaa ggaacggaga actggagcag gattacaaga aactccacc      660
catcctggac tcggatggga cctacttctt ctacagcaag ctcaactgtg atacagacag      720
ttggttgcaa ggagaaattt ttacctgtct cgtggtgcat gaggtctctc ataaccacca      780
cacacagaag aacctgtctc gctcccctgg taaatgagaa cagcatctag cggccgctcg      840
aggccggcaa ggccggatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca      900
actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt      960
gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt      1020
cagggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt      1080
atggctgatt atgatccggc tgctcgcgc gtttcgggtg tgacggtgaa aacctctgac      1140
acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag      1200
cccgtcaggc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgagg tcgactctag      1260
aggatcgatg ccccgccccg gacgaactaa acctgactac gacatctctg ccccttcttc      1320
gcggggcagt gcatgtaatc cttcagttg gttggtacaa cttgccaaact gggccctgtt      1380
ccacatgtga cacggggggg gaccaaacac aaaggggttc tctgactgta gttgacatcc      1440
ttataaatgg atgtgcacat ttgccaaacac tgagtggctt tcatactgga gcgacttttg      1500
cagtctgtgg actgcaacac aacattgcct ttatgtgtaa ctcttggtg aagctcttac      1560
accaatgctg ggggacatgt acctcccagg gggccaggaa gactacggga ggctacacca      1620
acgtcaatca gaggggcctg tgtagctacc gataagcgga ccctcaagag ggcattagca      1680

```

ES 2 671 728 T3

atagtgttta taaggccccc ttgttaaccc taaacgggta gcatatgctt cccgggtagt	1740
agtatatact atccagacta accctaattc aatagcatat gttaccaaac gggaagcata	1800
tgctatcgaa ttagggtag taaaagggtc ctaaggaaca gcgatatctc ccaccccatg	1860
agctgtcacg gttttattta catgggggtca ggattccacg agggtagtga accatthttag	1920
tcacaagggc agtggctgaa gatcaaggag cgggcagtga actctcctga atcttcgctt	1980
gcttcttcat tctccttctg ttagctaata gaataactgc tgagttgtga acagtaagggt	2040
gtatgtgagg tgctcgaaaa caaggthttca ggtgacgccc ccagaataaa atttggacgg	2100
gggggttcagt ggtggcattg tgctatgaca ccaatataac cctcacaac cccttgggca	2160
ataaatacta gtgtaggaat gaaacattct gaatatcttt aacaatagaa atccatgggg	2220
tggggacaaag ccgtaaaagac tggatgtcca tctcacacga atthtatggct atgggcaaca	2280
cataatccta gtgcaatatg atactgggggt tattaagatg tgtcccaggc agggaccaag	2340
acaggtgaac catgttggtta cactctattt gtaacaaggg gaaagagagt ggacgccgac	2400
agcagcggac tccactggtt gtctctaaca ccccgaaaa ttaaacgggg ctccacgcca	2460
atggggccca taaacaaaga caagtggcca ctctthtttt tgaattgtg gagtgggggc	2520
acgcgtcagc ccccacacgc cgcctgctg ttttggactg taaaataagg gtgtaataac	2580
ttggctgatt gtaacccgc taacctctgc ggtcaaacca cttgccaca aaacctacta	2640
tgggaccccg gggaatacct gcataagtag gtggcgggc caagataggg gcgcgattgc	2700
tgcgatctgg aggacaaatt acacacactt gcgcctgagc gccaaagcaca ggttggttg	2760
tcctcatatt cagcaggtcg ctgagagcac ggtgggctaa tgttgccatg ggtagcatat	2820
actacccaaa tatctggata gcatatgcta tcctaatacta tatctgggta gcataggcta	2880
tcctaatacta tatctgggta gcatatgcta tcctaatacta tatctgggta gtatatgcta	2940
tcctaattta tatctgggta gcataggcta tcctaatacta tatctgggta gcatatgcta	3000
tcctaatacta tatctgggta gtatatgcta tcctaatactg tatccgggta gcatatgcta	3060
tcctaataga gattagggtg gtatatgcta tcctaattta tatctgggta gcataacta	3120
cccaaataatc tggatagcat atgctatcct aatctatatac tgggtagcat atgctatcct	3180
aatctatatac tgggtagcat aggtatcct aatctatatac tgggtagcat atgctatcct	3240
aatctatatac tgggtagcat atgctatcct aatthtatatac tgggtagcat aggtatcct	3300
aatctatatac tgggtagcat atgctatcct aatctatatac tgggtagcat atgctatcct	3360
aatctgtatac cgggtagcat atgctatcct catgcatata cagtcagcat atgataccca	3420
gtagtagagt gggagtgtga tcctttgcat atgccgccac ctcccaaggg ggcgtgaatt	3480
ttcgctgctt gtcctthttc tgctgggtgc tccattctt aggtgaattt aaggaggcca	3540

ggctaaagcc gtcgcatgtc tgattgctca ccaggtaaata gtcgctaata tttccaacg	3600
cgagaagggtg ttgagcgcgg agctgagtga cgtgacaaca tgggtatgcc caattgcccc	3660
atgttgggag gacgaaaatg gtgacaagac agatggccag aaatacacca acagcacgca	3720
tgatgtctac tggggattta ttctttagtg cgggggaata cacggctttt aatacgattg	3780
agggcgcttc ctaacaagtt acatcactcc tgccttctc caccctcacc tccatcacct	3840
ccttcacttc cgtcatctcc gtcactcccc tccgcggcag ccccttccac catagggtgga	3900
aaccagggag gcaaactctac tccatcgta aagctgcaca cagtcaccct gatattgcag	3960
gtaggagcgg gctttgtcat aacaaggctc ttaatcgcat ccttcaaac ctcagcaaat	4020
atatgagttt gtaaaaagac catgaaataa cagacaatgg actcccttag cgggccaggt	4080
tgtgggcggg gtccaggggc cattccaaag gggagacgac tcaatggtgt aagacgacat	4140
tgtggaatag caagggcagt tctcgcctt aggttgtaaa gggaggtctt actacctcca	4200
tatacgaaca caccggcgac ccaagttcct tcgtcggtag tctttctac gtgactccta	4260
gccaggagag ctcttaaacc ttctgcaatg ttctcaaatt tcgggttgga acctcctga	4320
ccacgatgct ttccaaacca cctcctttt ttgcgcctgc ctccatcacc ctgaccccg	4380
ggtccagtgc ttgggccttc tctgggtca tctgcggggc cctgctctat cgtcccg	4440
ggcagtcag gtcaccatc tgggccacct tcttggtggt attcaaaata atcggcttc	4500
cctacagggt ggaaaaatgg ccttctacct ggagggggcc tgcgcggtgg agaccggat	4560
gatgatgact gactactggg actcctgggc ctcttttctc cactccacg acctctccc	4620
ctggctcttt caggaacttc cccctggct ctttcacgtc ctctacccg gcggcctcca	4680
ctacctctc gaccccgcc tccactacct cctcgacccc ggccctcact gcctcctga	4740
ccccggctc cactcctgc tctgcccct cctgctcctg cccctcctc tgcctctgc	4800
cctcctgcc ctctgctcc tgcctcctt gccctcctg ctctgccc tctgcccct	4860
cctgctcctg cccctcctgc cctcctcct gctcctgcc ctctgccc tctcctgct	4920
cctgcccctc ctgcccctcc tgcctcctg cctcctgcc ctctgctcc tgcctcct	4980
gcccctcctg ctctgccc tctgctcct gccctcctg ctctgccc tctgctcct	5040
gcccctcctg cccctcctgc cctcctcct gctcctgcc ctctgctcc tgcctcct	5100
gcccctcctg cccctcctgc tctgcccct cctcctgctc ctgcccctcc tgcctcct	5160
gcccctcctc ctgctcctgc cctcctgcc cctcctcctg ctctgccc tctcctgct	5220
cctgcccctc ctgcccctcc tgcctcctt cctgctcctg cccctcctgc cctcctcct	5280
gctcctgcc ctctcctgc tctgcccct cctgcccctc ctgcccctcc tctgctcct	5340
gcccctcctc ctgctcctgc cctcctgcc cctcctgcc ctctgccc tctcctgct	5400
cctgcccctc ctctgctcc tgcctcctt gctcctgcc ctctgctcc tgcctcct	5460

cctgttccac cgtgggtccc tttgcagcca atgcaacttg gacgtttttg ggggtctccgg 5520
 acaccatctc tatgtcttgg ccctgatcct gagccgcccc gggctcctgg tcttcgcct 5580
 cctcgtcctc gtccctcttc ccgtcctcgt ccattgggtat caccacctct tctttgaggt 5640
 ccactgccgc cggagccttc tgggccagat gtgtctccct tctctcctag gccatttcca 5700
 ggtcctgtac ctggcccttc gtcagacatg attcacacta aaagagatca atagacatct 5760
 ttattagacg acgctcagtg aatacagga gtgcagactc ctgccccctc caacagcccc 5820
 cccacctca tccccttcat ggtcgtctgc agacagatcc aggtctgaaa attccccatc 5880
 ctccgaacca tccctcgtcct catcaccaat tactcgcagc ccggaact cccgctgaac 5940
 atcctcaaga tttgcgtcct gagcctcaag ccaggcctca aattcctcgt cccctttttt 6000
 gctggacggt agggatgggg attctcggga cccctcctct tctcttcaa ggtcaccaga 6060
 cagagatgct actggggcaa cggagaaaa gctgggtgag gctgtgagg atcagcttat 6120
 cgatgataag ctgtcaaca tgagaattct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgctta 6180
 tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg 6240
 ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta ttttctaaa tacattcaa tatgtatccg 6300
 ctcatgagac aataacctg ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 6360
 attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgagg cattttgcct tctgtttttt 6420
 gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 6480
 ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa 6540
 cgttttcaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtt 6600
 gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 6660
 tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 6720
 gctgccataa ccattgagtga taacactgag gccaaacttac ttctgacaac gatcgaggga 6780
 ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggagc atgtaactcg ccttgatcgt 6840
 tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca 6900
 gcaatggcaa caacgttgag caaactatta actggcgaa tacttactct agcttcccgg 6960
 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcgcc 7020
 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt 7080
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag cctcccgta tcgtagttat ctacacgagc 7140
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 7200
 attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 7260
 cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaaa 7320

atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	cogtagaaaa	gatcaaagga	7380
tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	7440
ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	7500
ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	7560
cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaatact	gttaccagt	7620
gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	7680
gataagcgcg	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcgca	7740
acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	7800
gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	toggaaacag	agagcgcacg	7860
agggagcttc	cagggggaaa	cgcttggtat	ctttatagtc	ctgtcggggt	tgcacacctc	7920
tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	7980
agcaacgcgg	ccttttttac	gttcctggcc	ttttgctggc	cttgaagctg	tccctgatgg	8040
tcgatcatcta	cctgcctgga	cagcatggcc	tgcaacgcgg	gcacccgat	gccgccggaa	8100
gcgagaagaa	tcataatggg	gaaggccatc	cagcctcgcg	tgcgaacgc	cagcaagacg	8160
tagcccagcg	cgtcgccccc	gagatgcgcc	gcgtgcggct	gctggagatg	gcggacgcga	8220
tgatgatgtt	ctgccaaggg	ttggtttgcg	cattcacagt	tctccgcaag	aattgattgg	8280
ctccaattct	tggagtgggt	aatccgttag	cgaggtgccg	cctgcttca	tccccgtggc	8340
ccgttgctcg	cgtttgctgg	cggtgtcccc	ggaagaaata	tatttgcatg	tctttagttc	8400
tatgatgaca	caaacccccc	ccagcgtctt	gtcattggcg	aattcgaaca	cgcagatgca	8460
gtcggggcgg	cgcgggtccg	ggtccacttc	gcataattaag	gtgacgcgtg	tggcctcgaa	8520
caccgagcga	ccctgcagcg	accgcttaa	cagcgtcaac	agcgtgccgc	agatcccggg	8580
gggcaatgag	atatgaaaaa	gcctgaactc	accgcgacgt	ctgtcgagaa	gtttctgata	8640
gaaaagtctg	acagcgtctc	cgacctgatg	cagctctcgg	agggcggaaga	atctcgtgct	8700
ttcagcttcg	atgtaggagg	gcgtggatat	gtcctgcggg	taaatagctg	cgcgatgggt	8760
ttctacaaag	atcgttatgt	ttatcggcac	tttgcatcgg	cgcgctccc	gattccggaa	8820
gtgcttgaca	ttggggaatt	cagcgagagc	ctgacctatt	gcacctcccg	ccgtgcacag	8880
ggtgtcacgt	tgcaagacct	gcctgaaacc	gaactgcccg	ctgttctgca	gccggtcgcg	8940
gaggccatgg	atgcgatcgc	tgcgcccgat	cttagccaga	cagcggggtt	cggcccattc	9000
ggaccgcaag	gaatcgggtca	atacactaca	tggcgtgatt	tcatatgcgc	gattgctgat	9060
ccccatgtgt	atcactggca	aactgtgatg	gacgacaccg	tcagtgcgtc	cgtcgcgcag	9120
gctctcgatg	agctgatgct	ttgggcccag	gactgccccg	aagtccggca	cctcgtgcac	9180
gcggatttctg	gctccaacaa	tgtcctgacg	gacaatggcc	gcataacagc	ggtcattgac	9240

tggagcgagg cgatgttcgg ggattcccaa tacgaggtcg ccaacatctt cttctggagg	9300
ccgtgggttg cttgtatgga gcagcagacg cgctacttcg agcggaggca tccggagctt	9360
gcaggatcgc cgcggctccg ggcgatatatg ctccgcattg gtcttgacca actctatcag	9420
agcttggttg acggcaattt cgatgatgca gcttgggcgc agggtcgatg cgacgcaatc	9480
gtccgatccg gagccgggac tgtcggggcg acacaaatcg cccgcagaag cgcggccgctc	9540
tggaccgatg gctgtgtaga agtactcgcc gatagtggaa accgacgccc cagcaactcgt	9600
ccggatcggg agatggggga ggctaactga aacacggaag gagacaatac cggaaggaaac	9660
ccgcgctatg acggcaataa aaagacagaa taaaacgcac ggggtgtggg tcgtttgttc	9720
ataaacgcgg ggttcggtcc cagggctggc actctgtcga taccaccacg agaccccatt	9780
ggggccaata cgcgcggtt tcttcctttt cccacccca cccccaagt tcgggtgaag	9840
gccaggggct cgcagccaac gtcggggcgg caggccctgc catagccact ggccccgtgg	9900
gttagggacg ggggtcccca tggggaatgg tttatggttc gtgggggtta ttattttggg	9960
cgttgcggtg ggtcaggtcc acgactggac tgagcagaca gaccatggt ttttggatgg	10020
cctgggcatg gaccgcatgt actggcgcga cacgaacacc gggcgtctgt ggctgccaaa	10080
cacccccgac ccccaaaaac caccgcgcgg atttctggcg tgccaagcta gtcgaccaat	10140
tctcatgttt gacagcttat catcgcatat cggggcaacg ttgttgccat tgctgcaggc	10200
gcagaactgg taggtatgga agatctatac attgaatcaa tattggcaat tagccatatt	10260
agtcattggg tatatagcat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata cgttgtatct	10320
atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaata tgaccgcat gttgacattg	10380
attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat	10440
ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc	10500
cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca	10560
ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt	10620
tcatatgcca agtcgcgccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc cctggcatta	10680
tgcccagtac atgaccttac gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat	10740
cgtattacc atgggtgatgc gggtttggca gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga	10800
ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca	10860
aaatcaacgg gactttccaa aatgtogtaa taaccccgcc ccgttgacgc aaatgggcgg	10920
taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatctc	10980
tagaagctgg gtac	10994

<210>9
<211>12539

<212> ADN
<213> artificial

<220>

5 <223> vector de plásmido que codifica la construcción de fusión Fc-marcador IL-12

<400> 9

```

gtacctcgca gcaaagcaag atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg      60
ttttgctggg gtctccactc atggccatgt gggagctgga gaaagacggt tatgttgtag      120
aggtggactg gactcccgat gccctggag aaacagtga cctcacctgt gacacgcctg      180
aagaagatga catcacctgg acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga      240
ccctgacct cactgtcaaa gagtttctag atgctggcca gtacacctgc cacaaggag      300
gagagactct gagccactca catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggtcca      360
ctgaaatddd aaaaaatttc aaaaacaaga ctttcctgaa gtgtgaagca ccaaattact      420
ccggacgggt cactgtctca tggctggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca      480
agagcagtag cagttccct gactctcggg cagtgcacatg tggaatggcg tctctgtctg      540
cagagaaggt cactctggac caaagggact atgagaagta ttcagtgtcc tgccaggagg      600
atgtcacctg cccaactgcc gaggagacct tgccattga actggcggtg gaagcacggc      660
agcagaataa atatgagaac tacagcacca gcttcttcat caggacatc atcaaaccag      720
accgccccaa gaacttgagc atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg      780
agtacctga ctctggagc actccctatt cctacttctc cctcaagttc tttgttcgaa      840
tccagcgcaa gaaagaaaag atgaaggaga cagaggaggg gtgtaaccag aaaggtgcgt      900
tcctcgtaga gaagacatct accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag      960
ctcaggatcg ctattacaat tcctcgtaga gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc     1020
gatccggagg cgggtggtcg ggcggtggtg ggtcggtggt cggcggtatc aggtcattc     1080
cagtctctgg acctgccagg tgtcttagcc agtcccgaaa cctgctgaag accacagatg     1140
acatggtgaa gacggccaga gaaaaactga aacattattc ctgcactgct gaagacatcg     1200
atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta ccactggaac     1260
tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta gagagacttc tccacaaca agaggagct      1320
gcctgcccc acagaagacg tctttgatga tgaccctgtg ccttggtagc atctatgagg     1380
acttgaagat gtaccagaca gagttccagg ccatcaacgc agcacttcag aatcacaacc     1440
atcagcagat cattctagac aagggcatgc tgggtggcat cgatgagctg atgcagtctc     1500
tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca gaccottaca     1560
gagtgaatat gaagctctgc atcctgcttc acgccttcag caccgcgtc gtgaccatca     1620
acaggtgat gggctatctg agctccgct tgatcaagag aatcgagcct agaataccca     1680

```

ES 2 671 728 T3

agcccagtag	ccccccaggt	tcttcatgcc	cacctggtaa	catcttgggt	ggaccatccg	1740
tcttcatctt	ccccccaaag	ccaaggatg	cactcatgat	ctccctaacc	ccaagggtta	1800
cgtgtgtggt	ggtggatgtg	agcgaggatg	accagatgt	ccatgtcagc	tggtttgtgg	1860
acaacaaaga	agtacacaca	gcctggacgc	agccccgtga	agctcagtag	aacagtacct	1920
tccgagtgtg	cagtgccttc	cccatccagc	accaggactg	gatgaggggc	aaggagtcca	1980
aatgcaaggt	caacaacaaa	gcctcccag	cccccatoga	gagaaccatc	tcaaaaccca	2040
aaggaagagc	ccagacacct	caagtataca	ccatacccc	acctcgtgaa	caaagtcca	2100
agaagaaggt	tagtctgacc	tgctgggtca	ccaacttctt	ctctgaagcc	atcagtgtgg	2160
agtgggaaag	gaacggagaa	ctggagcagg	attacaagaa	cactccacc	atcctggact	2220
cggatgggac	ctacttcttc	tacagcaagc	tactgtgga	tacagacagt	tggttgcaag	2280
gagaaatttt	tacctgcttc	gtggtgcatg	aggctctcca	taaccaccac	acacagaaga	2340
acctgtctcg	ctccctgggt	aaatgagaac	agcatctagc	ggccgctcga	ggccggcaag	2400
gccggatcca	gacatgataa	gatacattga	tgagtttggg	caaaccacaa	ctagaatgca	2460
gtgaaaaaaa	tgctttattt	gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatttg	taaccattat	2520
aagctgcaat	aaacaagtta	acaacaacaa	ttgcattcat	tttatgtttc	aggttcaggg	2580
ggaggtgtgg	gaggtttttt	aaagcaagta	aaacctctac	aaatgtggta	tggctgatta	2640
tgatccggct	gcctcgcgcg	tttcggtgat	gacggtgaaa	acctctgaca	catgcagctc	2700
ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaagcg	gatgccggga	gcagacaagc	ccgtcaggcg	2760
tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggcgca	gccatgaggt	cgactctaga	ggatcgatgc	2820
cccgccccgg	acgaactaaa	cctgactacg	acatctctgc	cccttcttcg	cggggcagtg	2880
catgtaatcc	cttcagttgg	ttggtacaac	ttgccaactg	ggccctgttc	cacatgtgac	2940
acgggggggg	accaaacaca	aaggggttct	ctgactgtag	ttgacatcct	tataaatgga	3000
tgtgcacatt	tgccaacact	gagtggcttt	catcctggag	cagactttgc	agtctgtgga	3060
ctgcaacaca	acattgcctt	tatgtgtaac	tcttggtgga	agctcttaca	ccaatgctgg	3120
gggacatgta	cctcccaggg	gccaggaag	actacgggag	gctacaccaa	cgtcaatcag	3180
aggggcctgt	gtagctaccg	ataagcggac	cctcaagagg	gcattagcaa	tagtgtttat	3240
aaggccccct	tgtaaacctt	aaacgggtag	catatgcttc	ccgggtagta	gtatatacta	3300
tccagactaa	ccctaattca	atagcatatg	ttacccaacg	ggaagcatat	gctatcgaat	3360
tagggtagt	aaaagggtcc	taaggaacag	cgatatctcc	caccccatga	gctgtcacgg	3420
ttttatttac	atgggggtcag	gattccacga	gggtagtgaa	ccatttttagt	cacaagggca	3480
gtggctgaag	atcaaggagc	gggcagtga	ctctcctgaa	tcttcgcctg	cttcttcatt	3540

ctcccttcggt tagctaataag aataactgct gagttgtgaa cagtaagggtg tatgtgaggt 3600
 gctcgaaaac aaggtttcag gtgacgcccc cagaataaaa tttggacggg ggggttcagtg 3660
 gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcacaaacc ccttgggcaa taaatactag 3720
 tgtaggaatg aaacattctg aatatcttta acaatagaaa tccatggggg ggggacaagc 3780
 cgtaaagact ggaigtccat ctacacgaa tttatggcta tgggcaacac ataactcctag 3840
 tgcaatatga tactgggggtt attaagatgt gtcccaggca gggaccaaga cagggtgaacc 3900
 atgttggttac actctatttg taacaagggg aaagagagtgt gacgccgaca gcagcggact 3960
 ccaactggttg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc tccacgcaa tggggcccat 4020
 aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgttg agtgggggca cgcgtcagcc 4080
 cccacacgcc gccctgcggt tttggactgt aaaataaggg tgtaataact tggctgattg 4140
 taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgcccacaa aaccactaat ggcaccccg 4200
 ggaatacctg cataagtagg tgggcggggc aagatagggg cgcgattgct gcgatctgga 4260
 ggacaaatta cacacacttg cgctgagcg ccaagcacag ggttggttggt cctcatattc 4320
 acgaggtcgc tgagagcacg gtgggctaata gttgccatgg gtagcatata ctacccaaat 4380
 atctggatag catatgctat cctaacttat atctgggtag cataggctat cctaacttat 4440
 atctgggtag catatgctat cctaacttat atctgggtag tatatgctat cctaatttat 4500
 atctgggtag cataggctat cctaacttat atctgggtag catatgctat cctaacttat 4560
 atctgggtag tatatgctat cctaacttat atctgggtag catatgctat cctaacttat 4620
 attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag catatactac ccaaatatct 4680
 ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct 4740
 gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct 4800
 gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct 4860
 gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctgtatcc 4920
 gggtagcata tgctatcctc atgcatatac agtcagcata tgataccag tagtagagtgt 4980
 ggagtgcctat cctttgcata tgccgccacc tcccaagggg gcgtgaattt tcgctgcttg 5040
 tccttttctc gctggttgct ccattctta ggtgaattta aggaggccag gctaaagccg 5100
 tcgcatgtct gattgctcac caggtaaagt tcgctaattgt tttccaacgc gagaagggtgt 5160
 tgagcgcgga gctgagtac gtgacaacat gggtagccc aattgcccc tgttgggagg 5220
 acgaaaatgg tgacaagaca gatggccaga aatacaccaa cagcacgcat gatgtctact 5280
 ggggatttat tcttttagtc gggggaatac acggctttta atacgattga gggcgtctcc 5340
 taacaagtta catcactcct gcccttctc accctcatct ccatcacctc ctcatctcc 5400
 gtcactctcg tcacaccct ccgcggcagc cccttcacc ataggtggaa accaggagg 5460

caaatctact ccatcgtcaa agctgcacac agtcacccctg atattgcagg taggagcggg 5520
 ctttgtcata acaaggtcct taatcgcatc cttcaaaacc tcagcaaata tatgagtttg 5580
 taaaaagacc atgaaataac agacaatgga ctcccttagc gggccagggt gtgggcccggg 5640
 tccagggggc attccaaagg ggagacgact caatggtgta agacgacatt gtggaatagc 5700
 aagggcagtt cctcgcccta ggttgtaaag ggaggtotta ctacctcoat atacgaacac 5760
 accggcgacc caagttcctt cgtcggtagt cctttctacg tgactcctag ccaggagagc 5820
 tcttaaaccct tctgcaatgt tctcaaattt cgggttggaa cctccttgac cagcatgctt 5880
 tccaaaccac cctccttttt tgccgctgcc tccatcaccg tgaccccggg gtccagtgtt 5940
 tgggccttct cctgggtcat ctgccccggc ctgctctatc gctccccggg gcacgtcagg 6000
 ctaccatct gggccacctt cttggtggtt ttcaaaataa tcggcttccc ctacagggtg 6060
 gaaaaatggc cttctacctg gagggggcct ggcgggtgga gaccgggatg atgatgactg 6120
 actactggga ctctggggc tcttttctcc acgtccacga cctctcccc tggtctcttc 6180
 acgacttccc cccctggctc ttccacgtcc tctaccccgg cggcctccac tacctcctcg 6240
 accccggcct ccaactacct ctgcacccc ggctccactg cctcctcgac cccggcctcc 6300
 acctcctgt cctgccccct ctgctcctgc cctcctcct gctcctgcc ctctgcccc 6360
 tctgtcctt gccctcctg cccctcctgc tctgccccct cctgccccct ctgctcctgc 6420
 cctcctgccc cctcctcctg ctctgcccc tctgccccct cctcctgctc ctgccccctc 6480
 tgccccctct gctcctgccc ctctgcccc tctgtcctct gccctcctg cccctcctgc 6540
 tctgccccct cctgtcctg cccctcctgc tctgccccct cctgtcctg cccctcctgc 6600
 cctcctgccc cctcctcctg ctctgcccc tctgtcctct gccctcctg cccctcctgc 6660
 cctcctgct cctgccccct ctctgctcc tgccccctct gccctcctg cccctcctcc 6720
 tgctcctgccc cctcctgccc ctctcctcct tctgccccct cctcctgctc ctgccccctc 6780
 tgccccctct gccctcctc ctgtcctgc cctcctgccc cctcctcctg ctctgcccc 6840
 tctcctgct cctgccccct ctgccccctc tgccccctct cctgtcctg cccctcctcc 6900
 tgctcctgccc cctcctgccc ctctgcccc tctgccccct cctcctgctc ctgccccctc 6960
 tctgtcctct gccctcctg ctctgcccc tcccgctcct gctcctgctc ctgttccacc 7020
 gtgggtccct ttgcagccaa tgcaacttgg acgttttttg ggtctccgga caccatctct 7080
 atgtcttggc cctgatcctg agccgcccc ggctcctggt ctcccgctc ctgctcctcg 7140
 tctcttccc cgtcctcgtc catgggtatc acccctctt ctttgaggtc cactgccgcc 7200
 ggagccttct ggtccagatg tgtctccctt ctctcctagg ccatttccag gtctgtacc 7260
 tggccccctg tcagacatga ttacactaa aagagatcaa tagacatctt tattagacga 7320

cgctcagtga	atacagggag	tgacagctcc	tgccccctcc	aacagcccc	ccaccctcat	7380
ccccttcatg	gtcgtgtca	gacagatcca	ggtctgaaaa	ttccccatcc	tccgaaccat	7440
cctcgtcctc	atcaccaatt	actcgcagcc	cggaaaactc	ccgctgaaca	tcctcaagat	7500
ttgcgtcctg	agcctcaagc	caggcctcaa	attcctcgtc	cccccttttg	ctggacggta	7560
gggatgggga	ttctcgggac	ccctcctctt	cctcttcaag	gtcaccagac	agagatgcta	7620
ctggggcaac	ggaagaaaag	ctgggtgcgg	cctgtgagga	tcagcttata	gatgataagc	7680
tgtcaaacat	gagaattcct	gaagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	ttttataggt	7740
taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	7800
cggaaacctt	atttgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	tcagtagaca	7860
ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	7920
ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgccgc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccacga	7980
aacgctggtg	aaagtaaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	8040
actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	8100
gatgagcact	tttaaagtcc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtgttg	acgccgggca	8160
agagcaactc	ggtcgcgcga	tacactattc	tcagaatgac	ttgggttgagt	actcaccagt	8220
cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	8280
catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	8340
aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	8400
gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgcag	caatggcaac	8460
aacgttgccg	aaactattaa	ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	8520
agactggatg	gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgcctcggcc	ttccggctgg	8580
ctgggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	8640
actggggcca	gatggttaagc	cctcccgtat	cgtagttata	tacacgacgg	ggagtcaggc	8700
aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	8760
gtaactgtca	gaccaagttt	actcatatat	acttttagatt	gatttataaac	ttcattttta	8820
atttataaag	atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	tccttaaacg	8880
tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	8940
tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggc	9000
ggtttgtttg	cgggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	9060
agcgcagata	ccaaataactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	9120
ctctgtagca	cgcctacat	acctcgtctc	gctaactcctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	9180
tggcgataag	tcgtgtctta	cggggttggg	ctcaagacga	tagttaccgg	ataaggcgca	9240

ES 2 671 728 T3

gcgggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 9300
 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccc aaggagaaaa 9360
 ggcggacagg tatccggtaa ggcgcagggt cggaacagga gagcgacga gggagcttcc 9420
 agggggaaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 9480
 tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 9540
 ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc ttgaagctgt ccctgatggg cgtcatctac 9600
 ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccggaag cgagaagaat 9660
 cataatgggg aaggccatcc agcctcgctg cgcgaacgcc agcaagacgt agcccagcgc 9720
 gtcggccccg agatgcgcgc cgtgcggctg ctggagatgg cggacgcgat ggatatgttc 9780
 tgccaagggg tggtttgcc attcacagtt ctccgcaaga attgattggc tccaattctt 9840
 ggagtgggga atccgttagc gaggtgccgc cctgcttcat ccccgtaggc cgttgctcgc 9900
 gtttgctggc ggtgtccccg gaagaaatat atttgcagt cttagttct atgatgacac 9960
 aaacccccgc cagcgtcttg tcattggcga attcgaacac gcagatgcag tcggggcggc 10020
 gcgggtccgag gtccacttcg catattaagg tgacgcgtgt ggcctcgaa accgagcgac 10080
 cctgcagcga cccgctaac agcgtcaaca gcgtgccga gatccgggg ggcaatgaga 10140
 tatgaaaaag cctgaactca ccgcgacgtc tgcgagaag tttctgatcg aaaagttcga 10200
 cagcgtctcc gacctgatgc agctctcgga gggcgaagaa tctcgtgctt tcagcttcga 10260
 tgtaggaggg cgtggatatg tcctgcgggt aaatagctgc gccgatgggt tctacaaaga 10320
 tcgttatgtt tatcggcact ttgcatcggc cgcgtcccg attccggaag tgcttgacat 10380
 tggggaattc agcgagagcc tgacctattg catctccgc cgtgcacagg gtgtcacgtt 10440
 gcaagacctg cctgaaaccg aactgcccgc tgttctgcag ccggtcgcg aggccatgga 10500
 tgogatcgct gcggccgatc ttagccagac gagcgggttc ggccattcg gaccgcaagg 10560
 aatcgggtcaa tacactacat ggcgtgattt catatgcgcg attgctgatc cccatgtgta 10620
 tcaactggcaa actgtgatgg acgacaccgt cagtgcgtcc gtcgcgcagg ctctcgatga 10680
 gctgatgctt tgggccgagg actgccccga agtccggcac ctcgtgcacg cggatttcgg 10740
 ctccaacaat gtcctgacgg acaatggccg cataacagcg gtcattgact ggagcgaggc 10800
 gatgttcggg gattcccaat acgaggtcgc caacatcttc ttctggaggc cgtggttggc 10860
 ttgtatggag cagcagacgc gctacttcga gcggaggcat ccggagcttg caggatcgcc 10920
 gcggctccgg gcgtatatgc tccgcattgg tcttgaccaa ctctatcaga gcttggttga 10980
 cggcaatttc gatgatgcag cttgggcgca gggtcgatgc gacgcaatcg tccgatccgg 11040
 agccgggact gtcgggcgta cacaatcgc ccgcagaagc gcggccgtct ggaccgatgg 11100

ctgtgtagaa gtactcgccg atagtggaaa ccgacgcccc agcactcgtc cggatcgggg	11160
gatgggggag gctaactgaa acacggaagg agacaatacc ggaaggaacc cgcgctatga	11220
cggcaataaaa aagacagaat aaaacgcacg ggtgttggtt cgtttgttca taaacgcggg	11280
gttcggtccc agggctggca ctctgtcgat accccaccga gacccattg gggccaatac	11340
gcccgcgttt ctctcttttc cccacccac cccccaagtt cgggtgaagg cccagggtc	11400
gcagccaacg tcggggcggc aggcctgcc atagccactg gcccgtggg ttagggacgg	11460
ggtcccccat ggggaatggt ttatggttcg tgggggttat tattttgggc gttgcgtggg	11520
gtcaggtcca cgactggact gagcagacag acccatggtt tttgatggc ctgggcatgg	11580
accgcatgta ctggcgcgac acgaacaccg gggtctgtg gctgccaaac accccgacc	11640
cccaaaaacc accgcgcgga tttctggcgt gccaaagctag tcgaccaatt ctcatgtttg	11700
acagcttatc atcgcagatc cgggcaacgt tgttgccatt gctgcaggcg cagaactggt	11760
aggtatggaa gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta gtcattggtt	11820
atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta tatcataata	11880
tgtacattta tattgggtca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga ttattgacta	11940
gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttcgcg	12000
ttacataact tacggtaaatt ggccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga	12060
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat	12120
gggtggagta tttacggtaa actgccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa	12180
gtccgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgc ctggcattat gccagtaca	12240
tgaccttacg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcato gctattacca	12300
tggtgatgcg gttttggcag tacaccaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacgggat	12360
ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg	12420
actttccaaa atgtcgtaat aacccgccc cgttgacgca aatgggcggg aggcgtgtac	12480
ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatctct agaagctgg	12539

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento de combinación, que comprende

- un polipéptido de IL-12, o un vector de expresión de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido de IL-12, y
- un ligando no agonista de CTLA-4 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una molécula de tipo anticuerpo, en donde dicho ligando no agonista de CTLA-4 es capaz de unirse a CTLA-4 con una constante de disociación de al menos 10^{-7} M^{-1} , y en donde dicho ligando no agonista de CTLA-4 se proporciona como una forma de dosificación para una administración sistémica,

para su uso en la terapia de una neoplasia maligna, en donde

- dicho polipéptido de IL-12 o dicho vector de expresión de ácido nucleico se proporcionan mediante la administración en un tumor, en las proximidades de un tumor o en el nódulo linfático asociado a un tumor.

2. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende

- a. una secuencia de polipéptido al menos el 95 % idéntica a la secuencia de la p35 humana (SEQ ID 05), y
- b. una secuencia de polipéptido al menos el 95 % idéntica a la secuencia de la p40 humana (SEQ ID 06).

3. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna, de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende un fragmento cristizable de inmunoglobulina G.

4. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende un fragmento cristizable de inmunoglobulina G humana, subgrupo 4.

5. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna, de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho polipéptido de IL-12 comprende

- a. un fragmento cristizable de inmunoglobulina G y una secuencia de IL-12 humana recombinante o sintética, o
- b. una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID 01.

6. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ligando no agonista de CTLA-4 es una gamma inmunoglobulina que se une a CTLA-4.

7. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido de IL-12 se proporciona como una forma de dosificación para inyección intratumoral.

8. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ligando no agonista de CTLA-4 se proporciona como una forma de dosificación para inyección intravenosa o aplicación local.

9. Un medicamento de combinación de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de terapia de glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer cerebral secundario, metástasis cerebrales, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

10. Un medicamento de combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

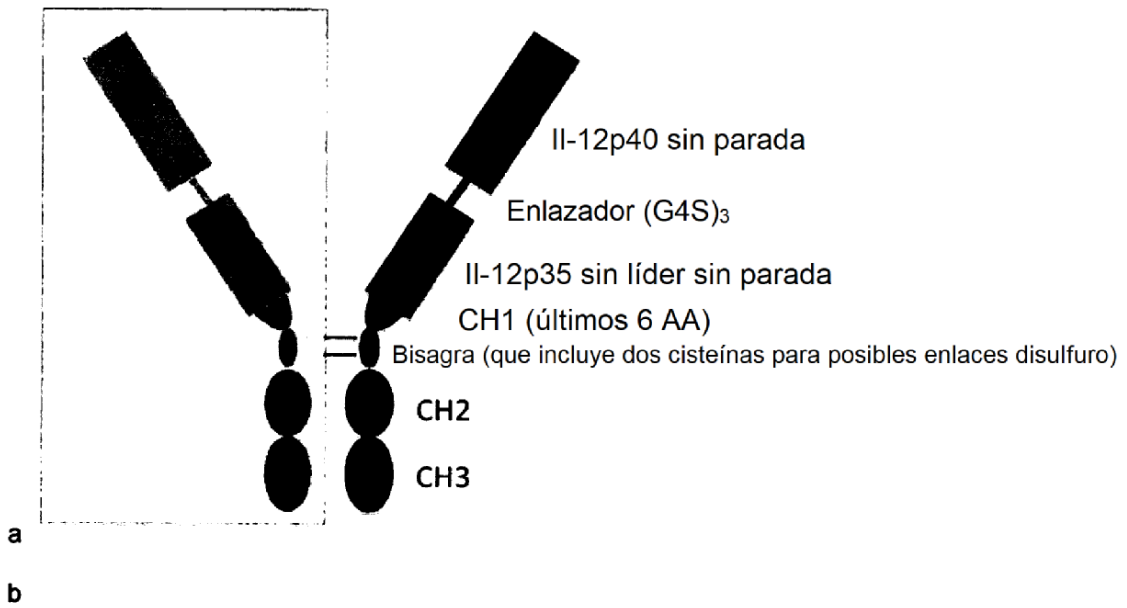
- dicho polipéptido de IL-12 es una proteína de fusión que comprende el aminoácido de p40 humana, la secuencia de aminoácidos de la p35 humana y el fragmento cristizable de la IgG4 humana,
- dicho polipéptido de IL-12 se proporciona como una forma de dosificación para administración intratumoral, y en donde
- dicho ligando no agonista de CTLA-4 es una inmunoglobulina G proporcionada como una forma de dosificación para una administración sistémica,

para su uso en el tratamiento de neoplasia maligna, en particular, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, cáncer cerebral secundario, metástasis cerebrales, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

11. Un medicamento de combinación para su uso en la terapia de una neoplasia maligna de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho vector de expresión de ácido nucleico es un adenovirus, un virus

adenoasociado, un lentivirus o un herpesvirus.

Fig. 1



α -huFc-HRP

Tinción de plata

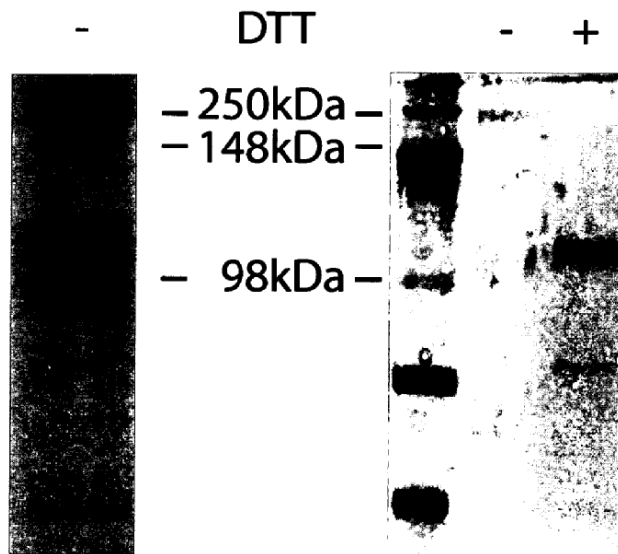


Fig. 1 c

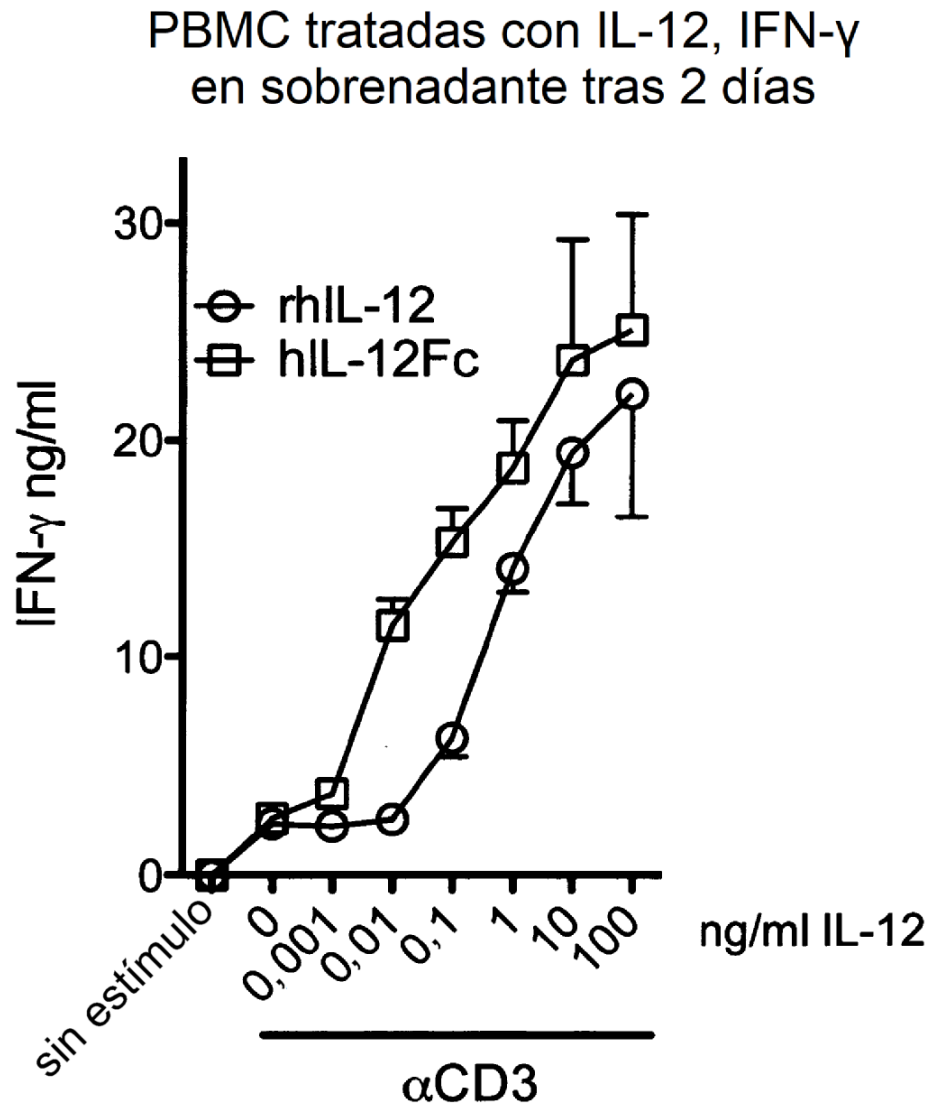


Fig. 2

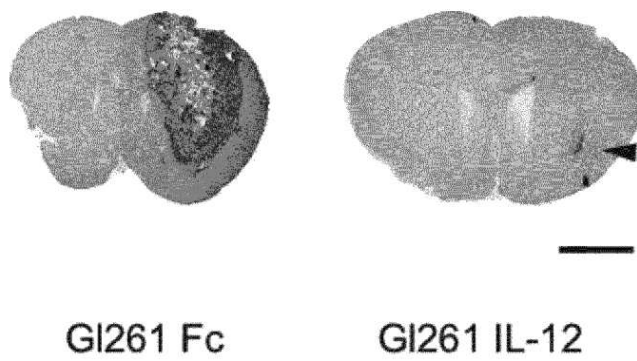


Fig. 3

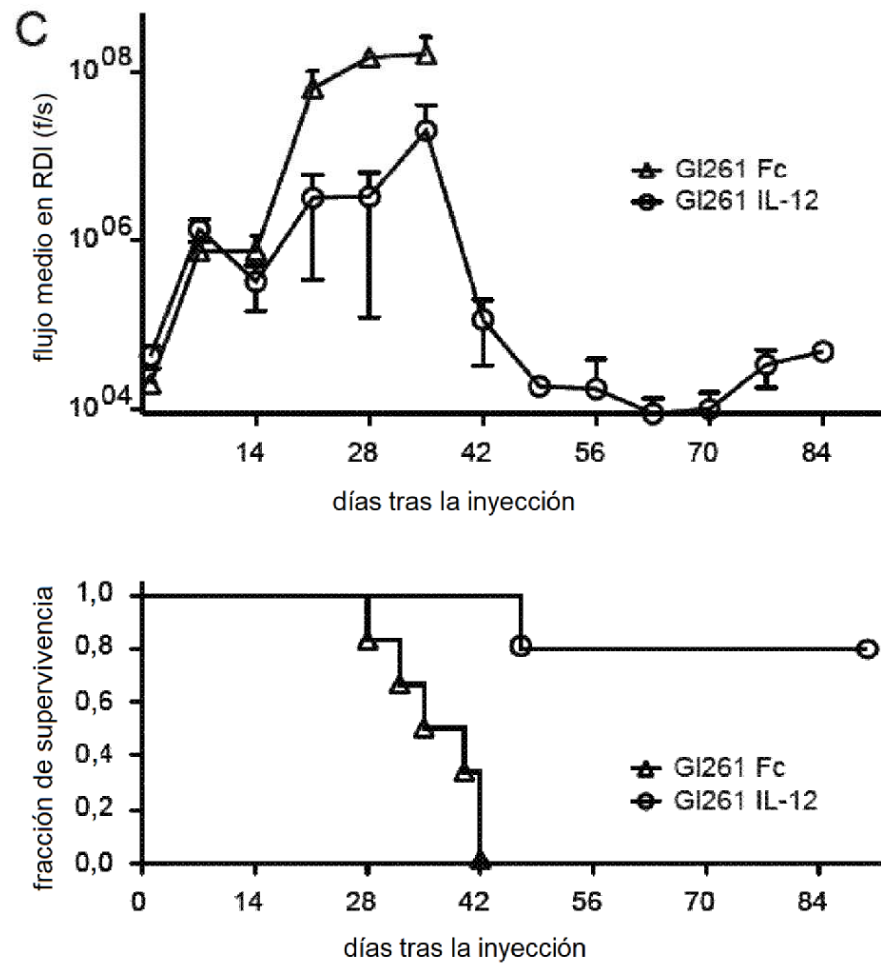


Fig. 4

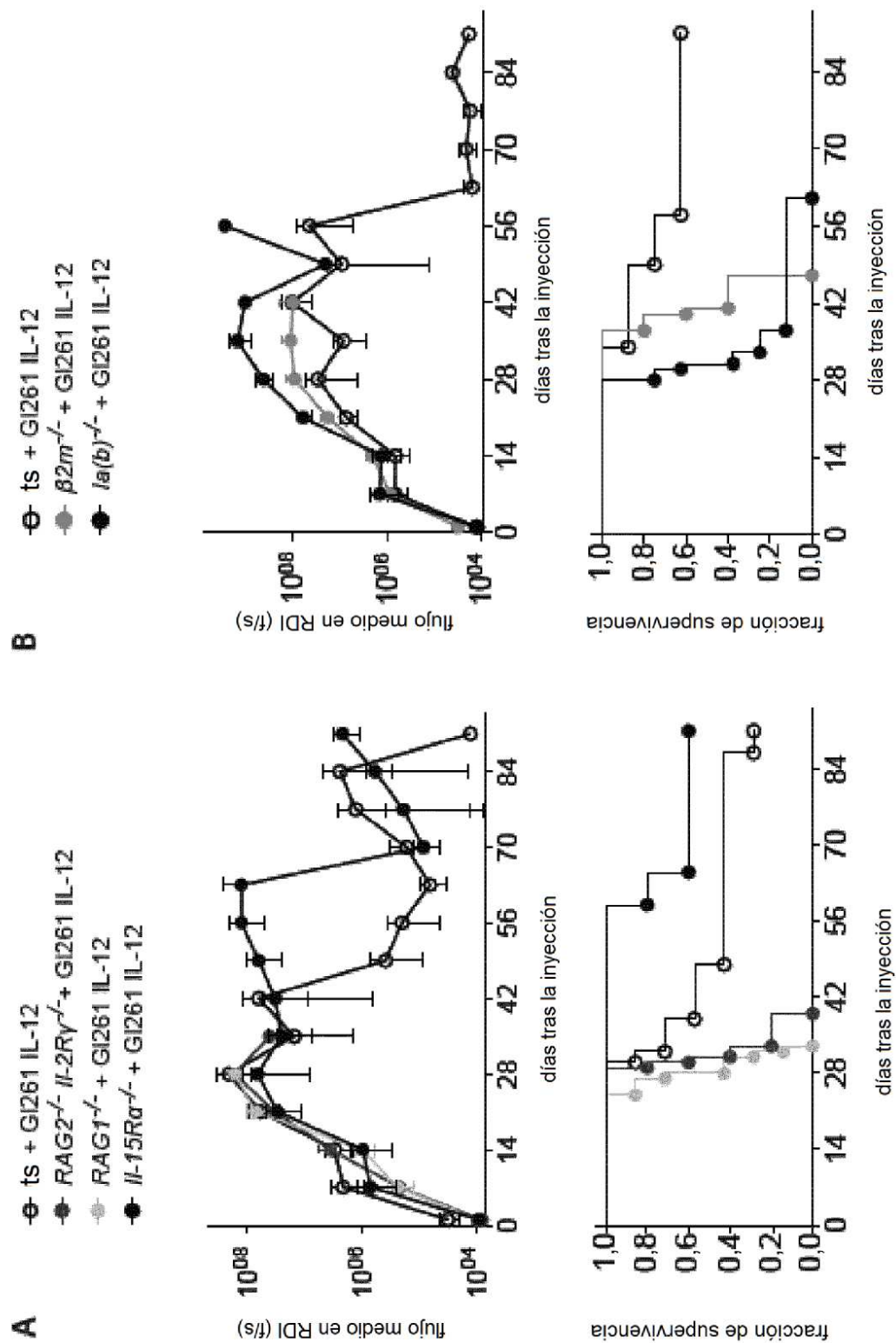


Fig. 5

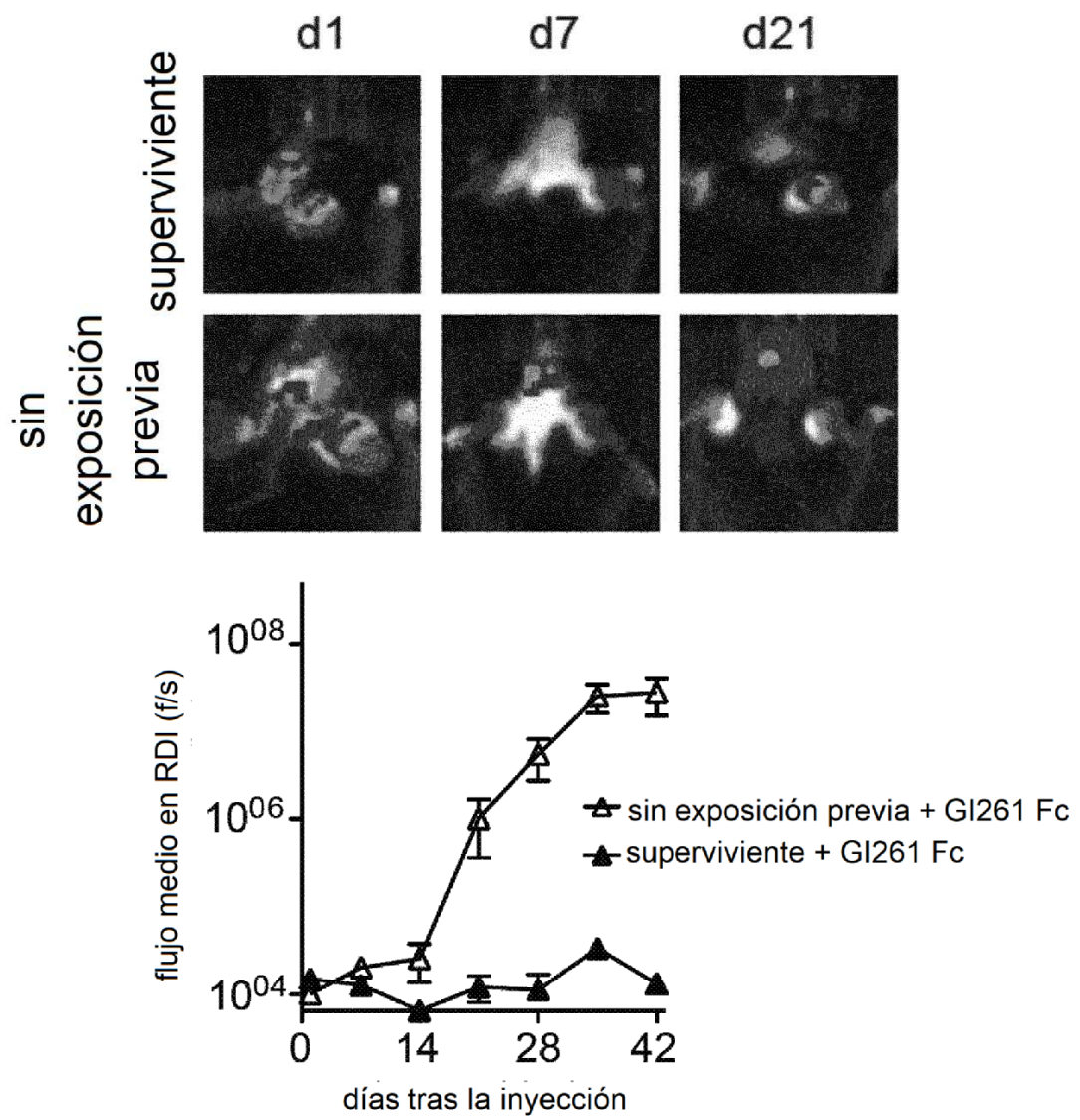


Fig. 6

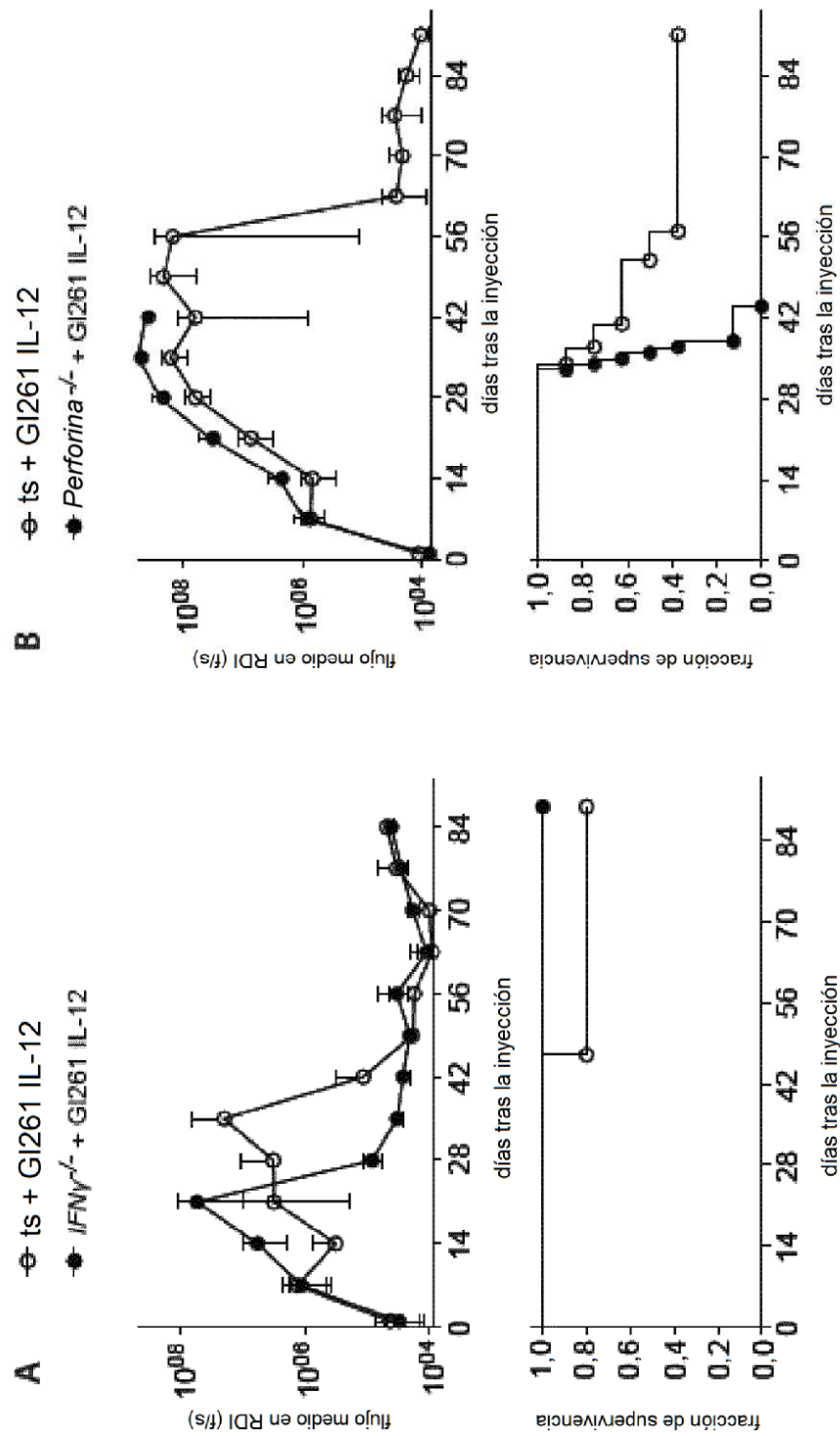


Fig. 7

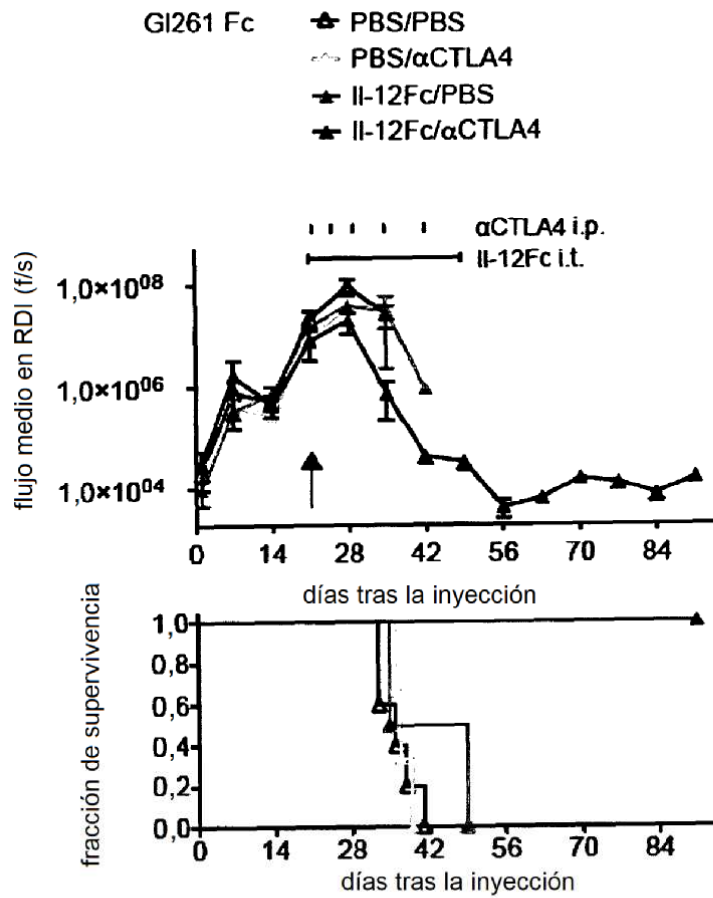


Fig. 8

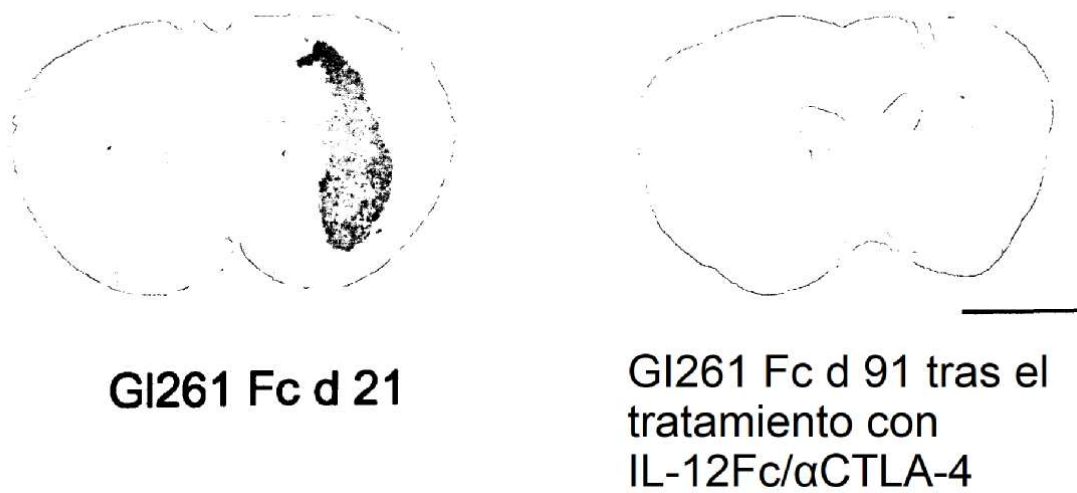
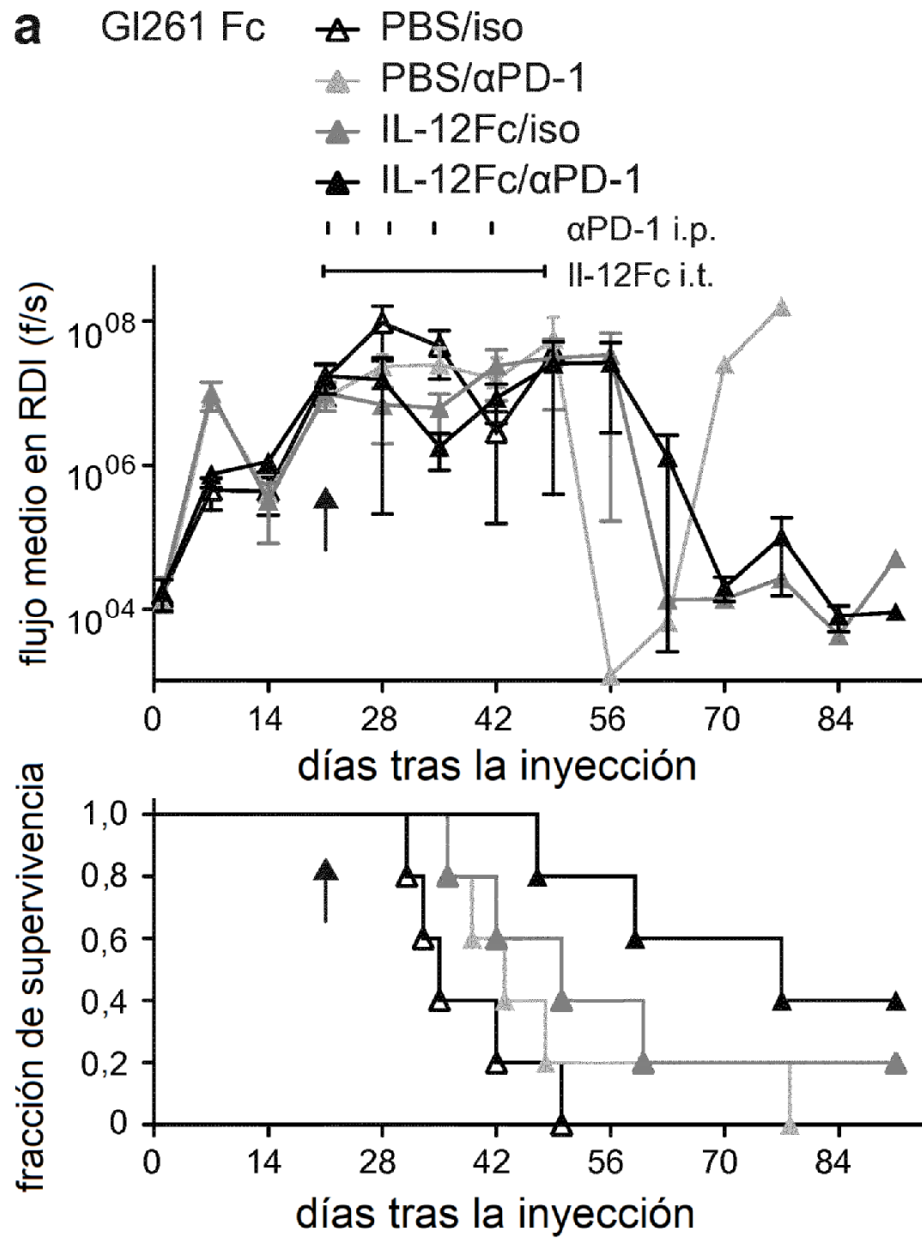


Fig. 9



PBS/PBS frente a IL-12Fc/αPD-1 $P = 0,0064$

Fig 10

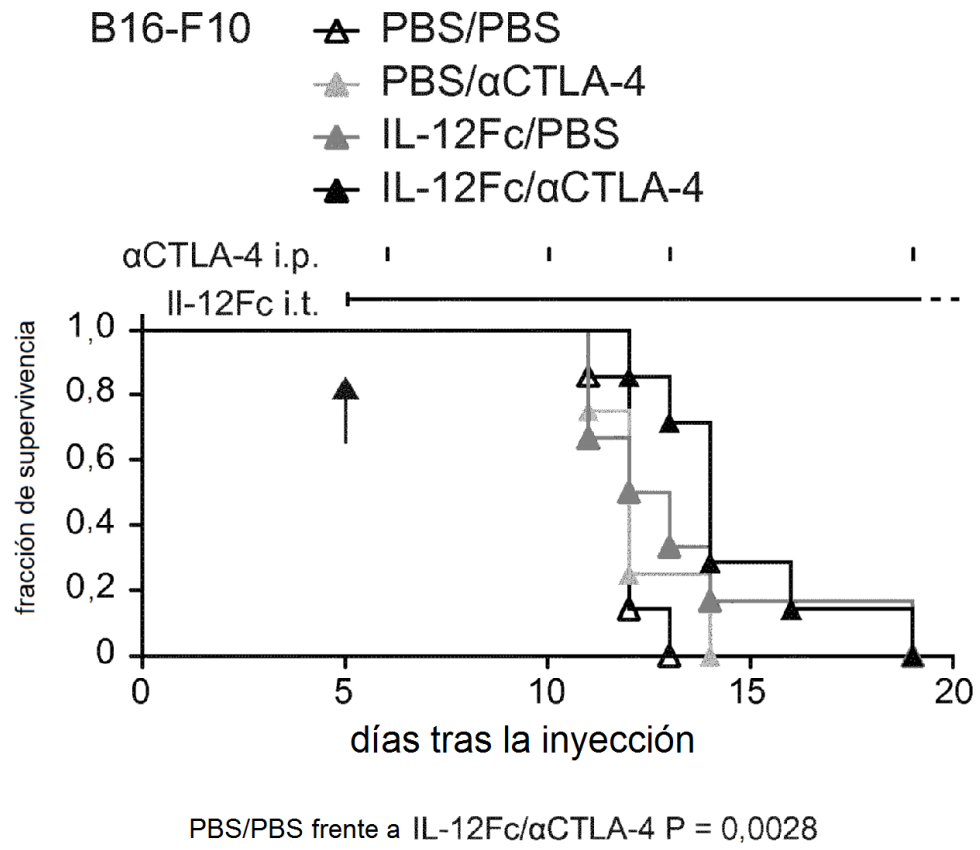


Fig. 11

