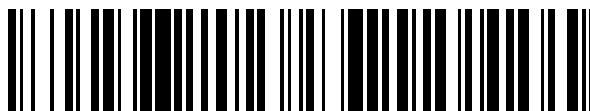


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 696**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32	(2006.01) C07K 7/08	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
C07K 14/495	(2006.01) A61K 48/00	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01) C12N 5/00	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01) C12N 15/62	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01) A61K 38/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) C07K 14/65	(2006.01)
C07K 14/71	(2006.01)	
C07K 16/30	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/IB2013/001155**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164694**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13734158 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2844667**

54 Título: **Proteínas de fusión dirigidas/inmunomoduladoras y métodos de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

30.04.2012 IN 1689CH2012
30.04.2012 IN 1690CH2012

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2018

73 Titular/es:

BIOCON LIMITED (100.0%)
20th KM Hosur Road Electronic City
Bangalore 560 100 Karnataka, IN

72 Inventor/es:

GOVINDAPPA, NAGARAJ;
SASTRY, KEDARNATH y
SOARES, MARIA, MELINA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 678 696 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión dirigidas/inmunomoduladoras y métodos de preparación de las mismas

5 **Antecedentes de la invención****Campo técnico**

10 La presente invención se refiere generalmente al campo de la generación de proteínas de fusión que van a usarse en terapia del cáncer, y más específicamente, a secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de fusión, en el que los polipéptidos de fusión o quiméricos comprenden al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmunitaria de las células cancerosas.

Técnica relacionada

15 El sistema inmunitario proporciona al cuerpo humano un medio para reconocer y defenderse él mismo contra microorganismos y sustancias reconocidas como extrañas o posiblemente peligrosas. Aunque la inmunoterapia pasiva del cáncer con anticuerpos monoclonales y la transferencia pasiva de linfocitos T para atacar células tumorales han demostrado eficacia clínica, el objetivo de la vacunación terapéutica activa para inducir estos
20 efectores inmunitarios y establecer memoria inmunológica contra células tumorales ha seguido siendo desafiante. Se han identificado varios antígenos específicos de tumor y asociados a tumor, aunque estos antígenos son generalmente débilmente inmunogénicos y los tumores emplean diversos mecanismos para crear un entorno tolerogénico que les permite evadir el ataque inmunológico. Estrategias para vencer tal tolerancia inmunitaria y activar robustos niveles de anticuerpo y/o respuestas de linfocitos T tienen la llave para la eficaz inmunoterapia
25 contra el cáncer. Más importante, necesitan explorarse proteínas individuales y cómo crear un polipéptido quimérico activo con una estructura terciaria activa.

El documento WO 2011/109789 desvela moléculas quiméricas que comprenden un resto de direccionamiento fusionado con un resto inmunomodulador, donde: (a) el resto de direccionamiento se une específicamente a una
30 molécula diana tal como un anticuerpo que se une específicamente a, por ejemplo, EGFR1, Her2/Neu, CD20, y (b) el resto inmunomodulador se une específicamente a una molécula tal como TGF-beta, TGFbeta RII, PO-L 1 (B7-H1) o PD-L2 (87-DC); 4-1 BB (CD 137); ligando de 4-1 BB (4-1 BBL; CD137L).

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona polinucleótidos, además de polipéptidos codificados por ellos, que se expresan en células cancerosas. Estos polinucleótidos y polipéptidos expresados son útiles en una variedad de métodos terapéuticos para el tratamiento de cáncer. La presente invención proporciona además métodos de reducción del crecimiento de células cancerosas que contrarrestan la tolerancia inmunitaria de células cancerosas, en las que los
40 linfocitos T siguen estando activos e inhiben el reclutamiento de reguladores T que son conocidos por suprimir la respuesta del sistema inmunitario al tumor. Así, los polipéptidos quiméricos generados por las secuencias de polinucleótidos de la presente invención son útiles para tratar el cáncer debido a la fusión expresada o polipéptidos quiméricos.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión quimérica que consiste en al menos un resto de direccionamiento para dirigir una célula cancerosa y al menos un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmunitaria de la célula cancerosa, en el que el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador están unidos por un espaciador de aminoácidos de longitud suficiente de restos de aminoácidos de manera que
50 ambos restos puedan unirse satisfactoriamente a su diana individual, en el que el resto inmunomodulador es TGF-βRII que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; en el que el espaciador de aminoácidos es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:11; y en el que el resto de direccionamiento es anti-EGFR1 que consiste en la cadena pesada SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera SEQ ID NO: 6; en el que SEQ ID NO:4 está unida mediante el espaciador de aminoácidos al extremo C de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 de anti-EGFR1. Los polipéptidos quiméricos/de
55 fusión de la invención son útiles para unirse a un receptor de célula cancerosa y reducir la capacidad de células cancerosas para evitar una respuesta inmunitaria.

La presente invención se basa en preparar proteínas quiméricas/de fusión por expresión de polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión que contrarrestan o invierten la tolerancia inmunitaria de células cancerosas. Las
60 células cancerosas son capaces de escapar de la eliminación por agentes quimioterapéuticos o anticuerpos dirigidos a tumor mediante mecanismos inmunosupresores específicos en el microentorno del tumor y tal capacidad de las células cancerosas es reconocida como tolerancia inmunitaria. Tales mecanismos inmunosupresores incluyen citocinas inmunosupresoras (por ejemplo, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)) y linfocitos T reguladores y/o células dendríticas (DC) mieloides inmunosupresoras. Contrarrestando la tolerancia inmunitaria inducida por tumor, la presente invención proporciona composiciones y métodos eficaces para el tratamiento del
65 cáncer, opcional en combinación con otro tratamiento del cáncer existente. La presente invención proporciona estrategias para contrarrestar la tolerancia inmunitaria inducida por tumor y potenciar la eficacia antitumoral de la

quimioterapia activando y haciendo uso de la antitumoral adaptativa mediada por linfocitos T contra células cancerosas resistentes o diseminadas.

5 También se desvela una molécula que incluye al menos un resto de direccionamiento fusionado con al menos un resto inmunomodulador. El resto de direccionamiento se une específicamente a una molécula diana, y el resto inmunomodulador se une específicamente a una de las siguientes moléculas: (i) Factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β); (ii) ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1) o ligando 2 de muerte programada 1 (PD-L2); (iii) ligando de activador de receptor del factor nuclear-KB (RANK) (RANKL); (iv) receptor de factor de crecimiento transformante-beta (TGF-pR); (v) muerte programada 1 (PD-1); (vi) receptor de 4-1BB o (vii) activador de receptor de nuclear factor-kB (RANK).
10

El resto de direccionamiento es un anti-EGFR1 que consiste en la cadena pesada SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera SEQ ID NO: 6.

15 En todavía un aspecto adicional, se proporciona una proteína de fusión quimérica que consiste en un resto de direccionamiento para dirigir una célula cancerosa, un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmunitaria y un espaciador de aminoácidos, en el que el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador están unidos por un espaciador de aminoácidos de longitud suficiente de restos de aminoácidos de manera que ambos restos puedan unirse satisfactoriamente a su diana individual, en el que el resto inmunomodulador es TGF-βRII que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; en el que el espaciador de aminoácidos es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 11; y en el que el resto de direccionamiento es anti-EGFR1 que consiste en la cadena pesada SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera SEQ ID NO: 6; en el que SEQ ID NO: 4 está unido mediante el espaciador de aminoácidos al extremo C de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 de anti-EGFR1.
20

25 El resto de direccionamiento de tumor es anti-EGFR1 que consiste en la cadena pesada SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera SEQ ID NO: 6.

El resto inmunomodulador se une específicamente al factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β) y es TGF-βRII que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
30

35 También se desvelan genes optimizados que codifican un polipéptido de fusión según la invención para tratar cáncer en un sujeto humano en el que los genes optimizados se han modificado para aumentar la expresión en un sujeto humano. También se desvelan genes optimizados que comprenden secuencias para codificar un resto de direccionamiento o un resto inmunomodulador seleccionado de SEQ ID NO: 12 a 28.

40 También se desvela un vector que comprende genes optimizados para tratar cáncer en un sujeto humano, en el que los genes optimizados se han modificado para aumentar las secuencias de CG. También se desvelan vectores que incluyen secuencias para codificar al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador seleccionado de SEQ ID NO: 12 a 28.

También se desvela un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:

- 45 a. proporcionar al menos un vector recombinante que comprende secuencias de nucleótidos que codifican al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador seleccionados de SEQ ID NO: 12 a 28; y
b. administrar el vector recombinante al sujeto en condiciones tales que dichas secuencias de nucleótidos se expresen a un nivel que produce una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión codificadas en el sujeto.

50 También se desvela un vector de expresión que comprende polinucleótidos de genes optimizados que codifican al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador seleccionados de SEQ ID NO: 12 a 28.

También se desvela una célula hospedadora recombinante transfectada con un polinucleótido que codifica un péptido de proteína de fusión de la presente invención.
55

También se desvela un proceso de preparación de una proteína de fusión de la presente invención que comprende:

- 60 a. transfectar una célula hospedadora con secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de fusión quiméricas para producir una célula hospedadora transformada, en el que las secuencias de polinucleótidos codifican al menos un resto de direccionamiento y al menos un resto inmunomodulador seleccionados de SEQ ID NO: 12 a 28; y
b. mantener la célula hospedadora transformada en condiciones biológicas suficientes para la expresión del péptido.

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión quimérica según la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica por cáncer. Preferentemente, la proteína de fusión se expresa en

una célula hospedadora y tales proteínas expresadas se administran en una cantidad terapéutica para reducir los efectos del cáncer en un sujeto en necesidad de la misma.

También se desvela un método de prevención o tratamiento de una enfermedad neoplásica. El método incluye administración a un sujeto en necesidad del mismo de una o más proteínas de fusión de la invención, en diversos aspectos, el sujeto se administra con una o más moléculas de la invención en combinación con otra terapia contra el cáncer, en un aspecto, la terapia contra el cáncer incluye una molécula quimioterapéutica, anticuerpo, inhibidor de cinasas de molécula pequeña, agente hormonal o agente citotóxico. La terapia contra el cáncer también puede incluir radiación ionizante, radiación ultravioleta, crioablación, ablación térmica, o ablación por radiofrecuencia.

También se desvela un método de preparación de proteínas de fusión de anticuerpo-péptido terapéuticamente activas, comprendiendo el método;

- a. preparar una secuencia de codón optimizada de dicha proteína de fusión;
- b. clonar la secuencia optimizada de dicha proteína de fusión en una célula hospedadora capaz de expresión transitoria o continuada;
- c. cultivar la célula hospedadora en un medio en condiciones adecuadas para cultivar y permitir que la célula hospedadora exprese la proteína clonada; y
- d. someter la proteína expresada a purificación y opcionalmente comprobar las capacidades de unión biespecífica de la proteína a sus dianas.

La proteína de fusión de anticuerpo-péptido terapéuticamente activa consiste en un resto de direccionamiento para dirigir una célula cancerosa, un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmunitaria y un espaciador de aminoácidos, en la que el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador están unidos por un espaciador de aminoácidos de longitud suficiente de restos de aminoácidos de manera que ambos restos puedan unirse satisfactoriamente a su diana individual, en la que el resto inmunomodulador es TGF- β RII que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; en la que el espaciador de aminoácidos es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:11; y en la que el resto de direccionamiento es anti-EGFR1 que consiste en cadena pesada SEQ ID NO: 5 y cadena ligera SEQ ID NO: 6; en la que SEQ ID NO:4 está unida mediante el espaciador de aminoácidos al extremo C de SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6 de anti-EGFR1.

El método de la presente invención proporciona secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de fusión de anticuerpo-péptido terapéuticamente activas y tal expresión puede realizarse en una línea celular transitoria o una línea celular estable. La expresión transitoria se lleva a cabo transfectando o transformando el hospedador con vectores que llevan las proteínas de fusión en células hospedadoras de mamífero

Una vez se expresan los péptidos de fusión, se someten preferentemente a purificación y pruebas *in vitro* para comprobar su biespecificidad, es decir, que tienen la capacidad para unirse a tanto el resto diana como al resto inmunomodulador. Tales pruebas pueden incluir prueba *in vitro* tal como ELISA o ensayos de unión de linfocitos NK/T para validar la unión de diana bi-funcional o estimulación de células inmunitarias.

En particular, una vez los péptidos de fusión específicos demuestran la bi-especificidad deseada, tales péptidos de fusión se seleccionan para sub-clonar en una línea celular estable para expresión y purificación a mayor escala. Tales líneas celulares estables se desvelan previamente, tal como una línea celular de mamífero, que incluye, pero no se limita, a HEK293, CHO o NSO.

En un aspecto adicional, el medio de cultivo puede mejorarse mediante adiciones a tal medio. Por ejemplo, el medio de cultivo puede incluir una sal de metal de transición divalente que se añade al cultivo celular ya sea inicialmente o en modo de lotes alimentados para reducir la acumulación de lactato durante el cultivo y/o reducir la heterogeneidad de las proteínas de fusión. Una sal de metal de transición deseable incluye un ión cinc y la adición del ión metálico puede llevarse a cabo durante diferentes fases de la producción.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-HER2/neu-TGF β RII en la región constante LC con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 1) y la cadena ligera de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 2) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de anti-HER2/neu y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión anti-EGFR1-TGF β RII en la región constante LC con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 6) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII

(resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de anti-EGFR1 y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

5 La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión anti-CTLA4-TGF β RII en la región constante LC con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 8) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de anti-CTLA4 y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

10 La Figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión anti-HER2/neu HC-4-1BB y LC-TGF β RII con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-HER2/neu/HC-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 1) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 2) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de anti-HER2/neu y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

20 La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-EGFR1 HC-4-1BB y LC-TGF β RII con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-EGFR1-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 5) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 6) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

25 La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-CTLA4 HC-4-1BB y LC-TGF β RII con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-CTLA4-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 7) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 8) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

30 La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-HER2/neu HC-PD1 y LC-TGF β RII con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-HER2/neu-PDI en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 1) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 2) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

35 La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-EGFR1 HC-PD1 y LC-TGF β RII con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la proteína de fusión de anti-EGFR1-PDI en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 5) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 6) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

40 La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-CTLA4 HC-PD1 y LC-TGF β RII con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-CTLA4-PDI en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 7) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 8) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

45 La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-HER2/neu HC-TGF β RII-4-1BB con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-HER2/neu-TGF β RII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 1 con una Lys adicional en el extremo C) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGF β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 2).

50 La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-EGFR1 HC-TGF β RII-4-1BB con

- 5 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-EGFR1-TGFβRII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 5 con una Lys adicional en el extremo C) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 6).
- 10 La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-CTLA4 HC-TGFβRII-4-1BB con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-CTLA4-TGFβRII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 7 con una Lys adicional en el extremo C) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 8).
- 15 La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión anti-HER2/neu HC-TGFβRII-PD1 con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-HER2/neu-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 1 con una Lys adicional en el extremo C) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD-1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 2).
- 20 La Figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de anti-EGFR1 HC-TGFβRII-PD1 con secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada de anti-EGFR1-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 5 con una Lys adicional en el extremo C) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD-1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 6).
- 25 La Figura 15 muestra la proteína de fusión anti-CTLA4 HC-TGFβRII-PD1 con secuencia de aminoácidos de proteína de fusión cadena pesada anti-CTLA4-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 7 con una Lys adicional en el extremo C) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD-1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 8).
- 30 La Figura 16 muestra un fragmento de la secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada de anti-HER2/neu con conector (SEQ ID NO: 12) y ECD de TGFβRII (SEQ ID NO: 13) que han sido optimizadas en codones para la expresión en célula CHO.
- 35 La Figura 17 muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 14), región variable de la cadena ligera de anti-HER2/neu (SEQ ID NO: 15) y región constante de la cadena pesada de anti-EGFR1 con conector (SEQ ID NO: 16) que han sido optimizadas en codones para la expresión en célula CHO.
- 40 La Figura 18 muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 17), región variable de la cadena ligera de anti-EGFR1 (SEQ ID NO: 18), región variable de la cadena pesada de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 19) y región variable de la cadena ligera de anti-CTLA4 (SEQ ID NO: 20) que han sido optimizadas en codones para la expresión en célula CHO.
- 45 La Figura 19 muestra la secuencia de nucleótidos de la molécula IgG1 anti-CD20 (SEQ ID NO: 21), región variable de la cadena pesada de anti-CD20 (SEQ ID NO: 22) y región variable de la cadena ligera de anti-CD20 (SEQ ID NO: 23) que han sido optimizadas en codones para la expresión en célula CHO.
- 50 La Figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos de 4-1BB (SEQ ID NO: 24) y cadena pesada de anti-IL6R (SEQ ID NO: 25) que han sido optimizadas en codones para la expresión en célula CHO.
- 55 La Figura 21 muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-IL6R (SEQ ID NO: 26), cadena pesada de anti-4-1BB (SEQ ID NO: 27) y región variable de la cadena ligera de anti-4-1BB (SEQ ID NO: 28) que han sido optimizadas en codones para la expresión en célula CHO.
- 60 La Figura 22 muestra el análisis de anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII purificadas en proteína A al 12 % de PAGE
- 65

- La Figura 23A muestra muestras de anti-HER2/neu-TGFβRII analizadas por cromatografía en proteína A/SEC y B muestra muestras de anti-EGFR1-TGFβRII analizadas por cromatografía en proteína A/SEC.
- 5 La Figura 24A muestra que las moléculas anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII se unen a TGFβ que indica que la proteína de fusión es funcional y B muestra que anti-HER2-TGFβRII inhibe la proliferación de la línea celular BT474 similar a Bmab200 (Herceptin).
- La Figura 25 muestra que anti-EGFR1-TGFβRII inhibe la proliferación de la línea celular A431 similar a Cetuximab.
- 10 La Figura 26 muestra que la actividad de ADCC de anti-HER2-TGFβRII en células BT474 es similar a la de Bmab200 (Herceptin).
- La Figura 27 muestra la actividad de ADCC de anti-EGFR1-TGFβRII en células A431 en las que las actividades de ADCC son similares a las de Cetuximab.
- 15 La Figura 28 muestra la actividad de ADCC de actividad de ADCC de anti-EGFR1-4-1BB en comparación con anti-EGFR1-TGFβRII y cetuximab.
- La Figura 29A muestra que la actividad de unión de anti-CTLA4-TGFβRII a TGFβ1 es comparable a anti-EGFR1-TGFβRII y B muestra la actividad de unión de anti-CTLA4-TGFβRII a CTLA4.
- 20 La Figura 30A muestra la actividad de unión de anti-CTLA4-TGFβRII para determinar el nivel de unión de PD1-Fc y B muestra la actividad de unión de anti-EGFR1-4-1BB para determinar la unión de 4-1BBL.
- 25 La Figura 31 muestra la actividad de unión de anti-EGFR1-4-1BB a EGFR y B muestra la actividad de unión de PD1-Fc-4-1BB para encontrar PDL1-Fc.
- La Figura 32 muestra la actividad de unión de anti-EGFR1-PD1 a EGFR y PD1.
- 30 La Figura 33 muestra fotografías de proteínas expresadas y alquilación de reducción de las mismas.
- La Figura 34A muestra el espectro de masas espectro de masas de la cadena ligera (LC) (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII y B muestra el espectro de masas de LC (reducido) deconvolucionado de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII.
- 35 La Figura 35 muestra el espectro de masas de la cadena pesada (HC) (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII.
- La Figura 36A muestra el espectro de masas de LC (reducido) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII y B muestra el espectro de masas de LC (reducido) deconvolucionado de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.
- 40 La Figura 37 muestra el espectro de masas de HC (reducido) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.
- La Figura 38A muestra el cromatograma de UV de péptidos trípticos de la proteína de fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII y B muestra el cromatograma iónico total (TIC) de péptidos trípticos de la proteína de fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII.
- 45 Las Figuras 39, 40 y 41 proporcionan listas de péptido tríptico esperado/observado de la cadena ligera, cadena pesada y motivo unido de la proteína de fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII, respectivamente.
- 50 La Figura 42A muestra el cromatograma de UV de péptidos trípticos de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII y B muestra el cromatograma iónico total (TIC) de péptidos trípticos de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.
- 55 La Figura 43 proporciona una lista de péptido tríptico esperado/observado de la cadena ligera de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.
- La Figura 44 muestra la lista de péptido tríptico esperado/observado de la cadena pesada de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.
- 60 La Figura 45 muestra la lista de péptido tríptico esperado/observado de la cadena pesada de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.
- La Figura 46 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión cantuzumab-TGFβRII en la región constante LC con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de cantuzumab (SEQ ID NO: 29) y secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cantuzumab (SEQ ID NO: 30) unida a restos de aminoácidos para TGF-βRII
- 65

(resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de cantuzumab y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

5 La Figura 47 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión cixutumumab-TGF β RII en la región constante LC con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de cixutumumab (SEQ ID NO: 31) y secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cixutumumab (SEQ ID NO: 32) unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de cixutumumab y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

10 La Figura 48 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión clivatuzumab-TGF β RII en la región constante LC con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de clivatuzumab (SEQ ID NO: 33) y secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de clivatuzumab (SEQ ID NO: 34) unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de clivatuzumab y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

15 La Figura 49 muestra las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión primumab-TGF β RII en la región constante LC con secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de primumab (SEQ ID NO: 35) y secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de primumab (SEQ ID NO: 36) unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita y en las que un conector (SEQ ID NO: 3) está situado entre la cadena ligera de primumab y TGF- β RII y se muestra en cursiva.

20 La Figura 50 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cantuzumab HC-4-1BB y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cantuzumab (SEQ ID NO: 29) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) que se muestra en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cantuzumab (SEQ ID NO: 30) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

25 La Figura 51 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cixutumumab HC-4-1BB y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cixutumumab (SEQ ID NO: 31) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cixutumumab (SEQ ID NO: 32) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

30 La Figura 52 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión clivatuzumab HC-4-1BB y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de clivatuzumab (SEQ ID NO: 33) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de clivatuzumab (SEQ ID NO: 34) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

35 La Figura 53 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión primumab HC-4-1BB y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de primumab (SEQ ID NO: 35) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de primumab (SEQ ID NO: 36) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

40 La Figura 54 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cantuzumab - HC-PD1 y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cantuzumab (SEQ ID NO: 29) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cantuzumab (SEQ ID NO: 30) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

45 La Figura 55 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cixutumumab - HC-PD1 y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cixutumumab (SEQ ID NO: 31) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cixutumumab (SEQ ID NO: 32) está unida a restos de aminoácidos para TGF- β RII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

50 La Figura 56 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión clivatuzumab - HC-PD1 y LC-TGF β RII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de clivatuzumab (SEQ ID NO: 33) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10)

está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de clivatuzumab (SEQ ID NO: 34) está unida a restos de aminoácidos para TGF-βRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

5 La Figura 57 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión primumab - HC-PD1 y LC-TGFβRII en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de primumab (SEQ ID NO: 35) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de primumab (SEQ ID NO: 36) está unida a restos de aminoácidos para TGF-βRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) identificados en negrita
10 con un conector (SEQ ID NO: 3) entremedias.

La Figura 58 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cantuzumab HC-TGFβRII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cantuzumab (SEQ ID NO: 29) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
15 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cantuzumab (SEQ ID NO: 30).

La Figura 59 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cixutumumab HC-TGFβRII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cixutumumab (SEQ ID NO: 31) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
20 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cixutumumab (SEQ ID NO: 32).

La Figura 60 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión clivatuzumab HC-TGFβRII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de clivatuzumab (SEQ ID NO: 33) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
25 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de clivatuzumab (SEQ ID NO: 34).

La Figura 61 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión primumab HC-TGFβRII-4-1BB en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de primumab (SEQ ID NO: 35) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
35 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para 4-1BB (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 9) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de primumab (SEQ ID NO: 36).

La Figura 62 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cantuzumab HC-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cantuzumab (SEQ ID NO: 29) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
40 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cantuzumab (SEQ ID NO: 30).

La Figura 63 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cixutumumab HC-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de cixutumumab (SEQ ID NO: 31) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
50 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cixutumumab (SEQ ID NO: 32).

La Figura 64 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión clivatuzumab HC-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de clivatuzumab (SEQ ID NO: 33) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
55 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de clivatuzumab (SEQ ID NO: 34).

La Figura 65 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión primumab HC-TGFβRII-PD1 en la que la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de primumab (SEQ ID NO: 35) está unida a un conector (SEQ ID NO: 3) mostrado en cursiva y la secuencia para TGFβRII (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 4) se
60 identifica en negrita y la secuencia de aminoácidos para PD1 (resto inmunomodulador) (SEQ ID NO: 10) está en fuente de texto escrito con el conector entremedias (SEQ ID NO: 11) y que incluye la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de primumab (SEQ ID NO: 36).

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la materia. Véanse, por ejemplo, Sambrook, et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo y no pretende ser limitante de la invención. Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" y "la" pretenden incluir las formas en plural también, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Los siguientes términos tienen los significados dados:

El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, significa una secuencia de nucleótidos conectada por enlaces fosfodiéster. Los polinucleótidos se presentan en el presente documento en la dirección de dirección 5' a 3'. Un polinucleótido de la presente invención puede ser una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) o molécula de ácido ribonucleico (ARN). Donde un polinucleótido es una molécula de ADN, esa molécula puede ser un gen o una molécula de ADNc. Bases de nucleótidos se indican en el presente documento por el código de una sola letra: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), inosina (I) y uracilo (U). Un polinucleótido de la presente invención puede prepararse usando técnicas convencionales muy conocidas para un experto en la materia.

El término "optimizado", como se usa en el presente documento, significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia optimizada de nucleótidos se manipula para retener completamente o en la medida de lo posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "parental". Las secuencias optimizadas en el presente documento han sido manipuladas para tener codones que se prefieren en células CHO de mamífero; sin embargo, también se prevé la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se denominan optimizadas. El término "expresión", como se usa en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular accionada por su promotor.

El término "transfección" de una célula, como se usa en el presente documento, significa que el material genético se introduce en una célula con el fin de modificar genéticamente la célula. La transfección puede llevarse a cabo mediante una variedad de medios conocidos en la técnica, tales como transducción o electroporación.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden extenderse localmente o a través de la circulación sanguínea y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de diversos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer ocular, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

El término "transgén" se usa en un sentido amplio para significar cualquier secuencia de nucleótidos heteróloga incorporada en un vector para la expresión en una célula diana y secuencias de control de la expresión asociadas, tales como promotores. Se aprecia por aquellos expertos en la materia que las secuencias de control de la expresión se seleccionarán basándose en la capacidad para promover la expresión del transgén en la célula diana. Un ejemplo de un transgén es un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión química de la presente invención.

El término "vector de expresión", como se usa en el presente documento, significa un vector que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo hospedador particular. Además de secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que también sirven a otras funciones. El término también incluye un plásmido o virus recombinante que comprende un polinucleótido que va a administrarse en una célula hospedadora, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Preferentemente, la célula hospedadora es una línea celular transitoria o una línea celular estable y más preferentemente una célula

hospedadora de mamífero y se selecciona del grupo que consiste en HEK293, CHO y NSO.

El término "sujeto," como se usa en el presente documento, significa un animal humano o vertebrado que incluye un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, rata y ratón.

5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad del compuesto objeto que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor médico u otro profesional clínico.

10 El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros componentes de formulación y no perjudicial para el receptor de la misma.

15 El término "recombinante", como se usa en el presente documento, significa una entidad genética distinta de la generalmente encontrada en la naturaleza. Como se aplica a un polinucleótido o gen, esto significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción y/o ligación, y otros procedimientos que producen la producción de una construcción que es distinta de un polinucleótido encontrado en la naturaleza.

20 El término "identidad sustancial" o "similitud sustancial", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que cuando se alinea óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente del 95 al 99 % de la secuencia.

25 El término "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para indicar un polímero de secuencia de al menos dos aminoácidos covalentemente unidos por un enlace amida.

30 El término "homólogo", como se usa en el presente documento y se refiere a péptidos, se refiere a similitud de secuencias de aminoácidos entre dos péptidos. Cuando una posición de aminoácido en ambos de los péptidos está ocupada por aminoácidos idénticos, son homólogos en esa posición. Así, por "sustancialmente homólogo" significa una secuencia de aminoácidos que es ampliamente, pero no completamente, homóloga, y que retiene la mayor parte o toda de la actividad de la secuencia a la que es homóloga. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente homólogo", como se usa en el presente documento, significa que una secuencia es al menos el 50 % idéntica, y preferentemente al menos el 75 % y más preferentemente el 95 % de homología con el péptido de referencia. Modificación de secuencias de péptidos adicional están incluida, tales como variaciones, deleciones, sustituciones o derivatizaciones menores de la secuencia de aminoácidos de las secuencias desveladas en el presente documento, mientras que el péptido tenga sustancialmente la misma actividad o función que los péptidos sin modificar. En particular, un péptido modificado retendrá actividad o función asociada al péptido sin modificar, el péptido modificado generalmente tendrá una secuencia de aminoácidos "sustancialmente homóloga" a la secuencia de aminoácidos de la secuencia sin modificar.

45 El término "administrar", como se usa en el presente documento, se define como la introducción física real de la composición en o sobre (según convenga) el sujeto hospedador. Todos y cada uno de los métodos de introducción de la composición en el sujeto se contemplan según la presente invención; el método no depende de cualquier medio particular de introducción y no debe interpretarse así. Los medios de introducción son muy conocidos para aquellos expertos en la materia, y preferentemente, la composición se administra por vía subcutánea o por vía intratumoral. Un experto en la materia reconocerá que, aunque puede usarse más de una vía para administración, una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Puede llevarse a cabo administración local o sistémica por administración que comprende administración o instilación de inmunovacunas en cavidades del cuerpo, inhalación o insuflación de un aerosol, o por introducción parenteral, que comprende administración intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea o intradérmica. En el supuesto caso de que el tumor esté en el sistema nervioso central, la composición debe administrarse por vía intratumoral debido a que no existe sensibilización del sistema inmunitario en el sistema nervioso central.

55 Aunque los agentes quimioterapéuticos pueden inducir muerte de células tumorales "inmunogénica" y facilitar la presentación cruzada de antígenos por células dendríticas, los tumores crean un entorno tolerogénico que les permite suprimir la activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas y evadir el ataque inmunológico por células efectoras inmunitarias. La presente invención proporciona estrategias para contrarrestar la tolerancia inmunitaria inducida por tumor en el microentorno del tumor y puede potenciar la eficacia antitumoral de la quimioterapia activando y haciendo uso de la inmunidad antitumoral adaptativa mediada por linfocitos T contra células cancerosas diseminadas.

65 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los anticuerpos o proteínas de fusión inmunomoduladores dirigidos de la presente invención pueden contrarrestar o invertir la tolerancia inmunitaria de las células cancerosas. Las células cancerosas son capaces de escapar de la eliminación por agentes quimioterapéuticos o anticuerpos dirigidos a tumor mediante mecanismos inmunosupresores específicos en el

microentorno del tumor y tal capacidad de las células cancerosas es reconocida como tolerancia inmunitaria. Contrarrestando la tolerancia inmunitaria inducida por tumor, la presente invención proporciona composiciones y métodos eficaces para el tratamiento de cáncer, opcional en combinación con otro tratamiento para el cáncer existente.

5 La presente divulgación proporciona composiciones y métodos de producción de proteínas de fusión que contrarrestan la tolerancia inmunitaria en el microentorno del tumor y promueven la inmunidad antitumoral adaptativa mediada por linfocitos T para el mantenimiento de protección duradera a largo plazo contra cánceres recurrentes o
10 diseminados. Estas proteínas de fusión se diseñan para facilitar las respuestas inmunitarias de linfocitos T a largo plazo eficaces contra células tumorales por al menos uno de los siguientes:

a. promover la muerte de células tumorales mediante potenciamiento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); y

15 b. aumentar la activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺ antitumorales por negación de la supresión inmunitaria mediada por linfocitos T reguladores y células supresoras mieloides. Estas respuestas inmunitarias antitumorales pueden activarse en tándem con la sensibilización de células tumorales a citotoxicidad mediada por efectores inmunitarios, estableciéndose así un bucle de retroalimentación positiva que aumenta la
citorreducción tumoral y refuerza la inmunidad antitumoral adaptativa.

20 Además, las proteínas de fusión de la presente invención se distinguen de y son superiores a las moléculas terapéuticas existentes en al menos uno de los siguientes aspectos: (i) Para contrarrestar la tolerancia inmunitaria en el microentorno del tumor y promover la inmunidad antitumoral adaptativa mediada por linfocitos T para el
25 mantenimiento de protección a largo plazo contra cánceres recurrentes o diseminados (para la prevención o tratamiento de diversos cánceres); (ii) Para producir composiciones de células inmunitarias para terapia celular adoptiva de diversos cánceres; y (iii) Para servir de adyuvantes o vacunas inmunitarios para la profilaxis de diversos
cánceres o enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos y/o proteínas de fusión inmunoestimulantes dirigidos de la invención proporcionan la capacidad de
30 alterar las redes inmunosupresoras en el microentorno del tumor. Los tumores emplean una amplia matriz de mecanismos reguladores para evitar o suprimir la respuesta inmunitaria. Células cancerosas promueven activamente la tolerancia inmunitaria en el microentorno del tumor mediante la expresión de citocinas y moléculas que inhiben la diferenciación y maduración de células dendríticas (DC) presentadoras de antígeno. Las citocinas
35 inmunosupresoras y ligandos producidos por células tumorales incluyen los siguientes: (i) Factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β); (ii) ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1; B7-H1); (iii) factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y (iv) interleucina-10 (IL-10).

Además de bloquear la maduración de células dendríticas (DC), estas moléculas promueven el desarrollo de
40 subconjuntos especializados de linfocitos T CD4⁺ inmunosupresores (linfocitos T reguladores; linfocitos Treg) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). Tregs son una sub-población minoritaria de linfocitos T CD4⁺ que expresan constitutivamente CD25 [la cadena α del receptor de interleucina-2 (IL-2)] y el factor de transcripción de la caja forkhead P3 (FOXP3). Los Tregs (linfocitos CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) mantienen la tolerancia inmunitaria restringiendo la activación, proliferación y funciones efectoras de una amplia gama de células inmunitarias, que
45 incluyen linfocitos T CD4 y CDS, linfocitos citolíticos espontáneos (NK) y NKT, linfocitos B y células presentadoras de antígenos (APC) *in vitro* e *in vivo*.

La acumulación de linfocitos Treg en el microentorno del tumor refuerza la tolerancia inmunitaria del tumor y facilita
50 la progresión y metástasis del tumor. El aumento de expresión de citocinas inmunosupresoras (TGF- β ; PD-L1) y Tregs infiltrantes de tumor se correlaciona con una reducción de la supervivencia de pacientes con diversos tipos de cánceres. Las proteínas de fusión de la presente invención inhiben moléculas inmunosupresoras clave expresadas por la célula tumoral dirigida o linfocitos Treg infiltrantes de tumor y células supresoras de mieloides (DCs o MDSC). Como tales, proporcionan la capacidad dirigida para inhibir el desarrollo o función de Tregs dentro del microentorno del tumor.

55 La presente divulgación proporciona un método de prevención o tratamiento de una enfermedad neoplásica. El método incluye la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una o más proteínas de fusión de la presente invención en combinación con otra terapia contra el cáncer, en el que la terapia contra el cáncer es una molécula quimioterapéutica, anticuerpo, inhibidor de cinasas de molécula pequeña, agente hormonal, agente citotóxico, agente terapéutico dirigido, agente antiangiogénico, radiación ionizante, radiación ultravioleta, crioablación, ablación térmica, o ablación por radiofrecuencia.

60 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos mono- o polivalentes naturales o artificiales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos
65 anti-Id contra anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítope de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo puede ser de cualquier origen animal que incluye aves y mamíferos. En un aspecto, el anticuerpo es, o

deriva de, un ser humano, murino (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, o pollo. Además, tal anticuerpo puede ser una versión humanizada de un anticuerpo. El anticuerpo puede ser mono-específico, bio-específico, tri-específico, o de mayor multi-especificidad. El anticuerpo en el presente documento incluye específicamente un anticuerpo "quimérico" en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada.

10 Ejemplos de anticuerpos que pueden incorporarse en las composiciones y métodos desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan, a anticuerpos tales como trastuzumab (anticuerpo anti-HER2/neu); pertuzumab (mAb anti-HER2); cetuximab (anticuerpo monoclonal quimérico contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico EGFR): panitumumab (anticuerpo anti-EGFR); nimotuzumab (anticuerpo anti-EGFR); zalutumumab (mAb anti-EGFR); necitumumab (mAb anti-EGFR); MDX-210 (anticuerpo bio-específico anti-HER-2 humanizado); MDX-210 (anticuerpo bio-específico anti-HER-2 humanizado); MDX-447 (anticuerpo bio-específico anti-receptor de EGF humanizado); rituximab (mAb anti-CD20 murino/humano quimérico); obinutuzumab (mAb anti-CD20); ofatumumab (mAb anti-CD20); tositumumab-1131 (mAb anti-CD20); ibritumomab tiuxetan (mAb anti-CD20); bevacizumab (mAb anti-VEGF); ramucirumab (mAb anti-VEGFR2); ranibizumab (mAb anti-VEGF); aflibercept (dominios extracelulares de VEGFR1 y VEGFR2 fusionados con Fc de IgG1); AMG386 (péptido de unión a angiopoyetina-1 y -2 fusionado con Fc de IgG1); dalotuzumab (mAb anti-IGF-1R); gemtuzumab ozogamicina (mAb anti-CD33); alemtuzumab (mAb anti-Campath-1/CD52); brentuximab vedotin (mAb anti-CD30); catumaxomab (mAb bio-específico que se dirige a la molécula de adhesión a células epiteliales y CD3); naptumomab (mAb anti-5T4); girentuximab (anti-anhidrasa carbónica ix); o farletuzumab (anti-receptor de folato). Otros ejemplos incluyen anticuerpos tales como Panorex™ (17-1 A) (anticuerpo monoclonal murino); Panorex (@ (17-1 A) (anticuerpo monoclonal murino quimérico); BEC2 (mAb anti-idiotípico, imita al epítipo GD) (con BCG): Oncolym (anticuerpo monoclonal contra Lym-1); Ab SMART M 1 95, 13' 1 LYM-1 humanizado (Oncolym), Ovarex (B43,13, mAb de ratón anti-idiotípico); mAb 3622W94 que se une a EGP40 (17- 1 A), antígeno pancarcinoma en adenocarcinomas; Zenapax (SMART anti-Tac (receptor de IL-2); Ab SMART M1 95, Ab humanizado, humanizado); NovoMAb-G2 (Ab específico de pancarcinoma); TNT (mAb quimérico contra antígenos de histona); TNT (mAb quimérico contra antígenos de histona); GJiomab-H (Abs monoclonales humanizados); Mab GN1-250; EMD-72000 (antagonista de EGF quimérico); LymphoCide (anticuerpo IL.L.2 humanizado); y MDX-260 bio-específico, dianas GD-2, Ab ANA, Ab SMART IDiO, Ab SMART ABL 364 o ImmuRAIT-CEA.

35 Se han empleado diversos métodos para producir anticuerpos. La tecnología de hibridomas, que se refiere a una línea celular clonada que produce un único tipo de anticuerpo, usa células de diversas especies, que incluyen ratones (murina), hámsteres, ratas y seres humanos. Otro método de preparación de un anticuerpo usa ingeniería genética que incluye técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, anticuerpos preparados a partir de estas técnicas incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo quimérico combina ADN que codifica regiones de más de un tipo de especie. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivar de la región variable de un ratón y la región constante de un ser humano. Un anticuerpo humanizado procede predominantemente de un ser humano, aún cuando no contenga porciones no humanas. Al igual que un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado puede contener una región constante completamente humana. Pero a diferencia de un anticuerpo quimérico, la región variable puede derivar parcialmente de un ser humano. Las porciones sintéticas no humanas de un anticuerpo humanizado frecuentemente proceden de CDR en anticuerpos murinos. En cualquier caso, estas regiones son cruciales para permitir que el anticuerpo reconozca y se una a un antígeno específico.

50 En una realización, un hibridoma puede producir una proteína de fusión dirigida que comprende un resto de direccionamiento y un resto inmunomodulador. El resto de direccionamiento de la proteína de fusión quimérica de la invención está unido o fusionado con el resto inmunomodulador con un conector en el que el espaciador de aminoácidos es GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3) o EPKSCDK (SEQ ID NO: 11).

55 Un fragmento de anticuerpo puede incluir una porción de un anticuerpo intacto, por ejemplo que incluye la unión al antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; fragmentos Fc o productos de fusión de Fc; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo. Un anticuerpo intacto es uno que incluye una región variable de unión al antígeno, además de un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos o cualquier otro Fc modificado (por ejemplo, glucosilación u otro Fc modificado).

65 Las proteínas de fusión quiméricas de la presente invención pueden sintetizarse por técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, por síntesis química tal como síntesis de péptidos en fase sólida. Tales métodos son conocidos para aquellos expertos en la materia. En general, estos métodos emplean o bien métodos de síntesis en fase sólida o en fase de disolución, muy conocidos en la técnica. Específicamente, los métodos

comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos adecuadamente protegidos a una cadena de péptido en crecimiento. Normalmente, o bien el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido se protege por un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido o derivado puede entonces o bien unirse a un soporte sólido inerte o utilizarse en solución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) adecuadamente protegido, en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. El grupo protector se elimina entonces de este resto de aminoácido recién añadido y entonces se añade el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido), etc. Después de que todos los aminoácidos deseados se hayan unido en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector restante y cualquier soporte sólido se eliminan ya sea secuencialmente o simultáneamente para proporcionar el polipéptido final. Por modificación simple de este procedimiento general, es posible añadir más de un aminoácido de una vez a una cadena en crecimiento, por ejemplo, acoplado (en condición que no racemice los centros quirales) un tripéptido protegido con un dipéptido apropiadamente protegido para formar, después de la desprotección, un pentapéptido.

Grupos protectores típicos incluyen t-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), benxiloxicarbonilo (Cbz), p-toluenosulfonilo (Tos); 2,4-dinitrofenilo, bencilo (Bzl), bifenilisopropiloxi-carboxicarbonilo, ciclohexilo, isopropilo, acetilo, o-nitrofenilsulfonilo, y similares. De estos, se prefieren Boc y Fmoc.

Soportes sólidos típicos son generalmente materiales poliméricos reticulados. Éstos incluyen polímeros basados en estireno reticulados con divinilbenceno, por ejemplo, copolímeros de divinilbenceno-hidroximetilestireno, copolímeros de divinilbenceno-clorometilestireno y copolímeros de divinilbenceno-benzhidrilaminopoliestireno. Los copolímeros de divinilbenceno-benzhidrilaminopoliestireno, como se ilustra en el presente documento usando resina de p-metil-benzhidrilamina, ofrecen la ventaja de introducir directamente un grupo funcional de amida en la cadena de péptido, cuya función es retenida por la cadena cuando la cadena se escinde del soporte.

En un método, los polipéptidos se preparan por síntesis química en fase sólida convencional en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems, Inc. (ABI) 430A usando una resina que permite la síntesis de la forma de péptido de amida y usando derivados de aminoácido t-Boc (Peninsula Laboratories, Inc.) con disolventes y reactivos estándar. Polipéptidos que contienen ya sea aminoácidos L o D pueden sintetizarse de este modo. La composición de polipéptido se confirma por análisis cuantitativo de aminoácidos y la secuencia específica de cada péptido puede ser determinada por análisis de secuencias.

Preferentemente, los polipéptidos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante sintetizando ADN que codifica el polipéptido deseado. Una vez se han sintetizado o aislado secuencias codificantes para los polipéptidos deseados, pueden clonarse en cualquier vector adecuado para la expresión. Numerosos vectores de clonación son conocidos para aquellos expertos en la materia, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión de elección. El gen puede ponerse bajo el control de un promotor, sitio de unión al ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (denominados conjuntamente en el presente documento elementos de "control"), de manera que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido deseado se transcribe en ARN en la célula hospedadora transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia codificante puede o puede no contener un péptido señal o secuencia conductora. Pueden añadirse secuencias conductoras heterólogas a la secuencia codificante que producen la secreción del polipéptido expresado a partir del organismo hospedador. También pueden ser deseables otras secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión de las secuencias de proteínas con respecto al crecimiento de la célula hospedadora. Tales secuencias reguladoras son conocidas para aquellos expertos en la materia, y ejemplos incluyen aquellos que producen la expresión de un gen para ser encendido o apagado en respuesta a un estímulo químico o físico, que incluye la presencia de un compuesto regulador. Otros tipos de elementos reguladores también pueden estar presentes en el vector, por ejemplo, secuencias potenciadoras.

Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden unirse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector, tal como los vectores de clonación descritos anteriormente. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

El vector de expresión puede entonces usarse para transformar una célula hospedadora apropiada. Se conocen en la técnica varias líneas celulares de mamífero e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, HEK293, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino de Madin-Darby ("MDBK"), células NOS derivadas de células de carcinoma, tales como sarcoma, además de otros. Similarmente, hospedadores bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.* encontrarán uso con las presentes construcciones de expresión. Hospedadores de levadura útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Las proteínas también pueden expresarse en tripanosomas.

Dependiendo del sistema de expresión y hospedador seleccionado, las proteínas de la presente invención se producen cultivando células hospedadoras transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones por las que la proteína de interés se expresa. La proteína se aísla entonces de las células hospedadoras y se purifica. Si el sistema de expresión secreta la proteína en medio de crecimiento, la proteína puede purificarse directamente a partir del medio. Si la proteína no se secreta, se aísla de lisados celulares. La selección de condiciones de crecimiento y métodos de recuperación apropiados está dentro de la experiencia de la materia. Una vez purificadas, las secuencias de aminoácidos de las proteínas pueden determinarse, es decir, por ciclo repetitivo de degradación de Edman, seguido de análisis de aminoácidos por HPLC. También se conocen en la técnica otros métodos de secuenciación de aminoácidos.

Una vez sintetizado o producido de otro modo, puede probarse la actividad inhibidora de un polipéptido candidato evaluando la capacidad del candidato para inhibir la translocación nuclear inducida por lipopolisacárido de NF- κ .B, por ejemplo, usando células endoteliales murinas.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden formularse en composiciones terapéuticas en una variedad de formas de dosificación tales como, pero no se limitan a, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida depende del modo de administración y el tipo de cáncer particular dirigido. Las composiciones también incluyen preferentemente vehículos, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, muy conocidos en la técnica, tales como albúmina de suero humano, intercambiadores iónicos, alúmina, lecitina, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, y sales o electrolitos tales como sulfato de protamina. Vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Métodos de preparación propiamente dichos de tales composiciones son conocidos, o serán evidentes, para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 18ª edición, 1990.

Las composiciones anteriores pueden administrarse usando modos de administración convencionales que incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o subcutánea. La administración local a un tumor en cuestión, o a un sitio de inflamación, por ejemplo, inyección directa en una articulación artrítica, también encontrará uso con la presente invención.

Dosis terapéuticamente eficaces serán fácilmente determinadas por un experto en la materia y dependerán de la gravedad y evolución de la enfermedad, la salud del paciente y respuesta al tratamiento, y el criterio del médico práctico.

Parte experimental

A continuación están ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, debe permitirse cierto error experimental y desviación.

Ejemplo 1

Se expresaron proteínas de fusión que comprenden cadena pesada de IgG unida a ligandos inmunomoduladores (ya sea supresores o activadores) por genes de codón optimizado para la expresión de células CHO. Las secuencias de nucleótidos de codón optimizado definidas por SEQ ID NO: 12 a 28 se expresaron en células (CHO) y las proteínas quiméricas/de fusión expresadas se muestran en la Tabla 1

Detalles de las proteínas de fusión
cadena pesada de anti-HER2/neu + ECD de TGF β -RII y cadena ligera de anti-HER2/neu
cadena pesada de anti-EGFR1 + ECD de TGF β -RII y cadena ligera de anti-EGFR1
cadena pesada de anti-CTLA4 + ECD de TGF β -RII y cadena ligera de anti-CTLA4
cadena pesada de anti-CTLA4 + ectodominio de PD1 y cadena ligera de anti-CTLA4
cadena pesada de anti-HER2/neu + 4-1BBL y cadena ligera de anti-HER2/neu
cadena pesada de anti-EGFR1 + 4-1BBL y cadena ligera de anti-EGFR1
cadena pesada de anti-CTLA4 + 4-1BBL y cadena ligera de anti-CTLA4
ectodominio de PD1-Fc-4-1BBL
ECD de TGF β RII-Fc-4-1BBL
cadena pesada de anti-EGFR1 + ectodominio de PD1 y cadena ligera de anti-EGFR1
cadena pesada de anti-CD20 + 4-1BBL y cadena ligera de anti-CD20
cadena pesada de anti-HER2/neu + ectodominio de PD1 y cadena ligera de anti-HER2/neu
cadena pesada de anti-IL6R + ectodominio de PD1 y cadena ligera de anti-IL6R
cadena pesada de anti-IL6R + ECD de TGF β -RII y cadena ligera de anti-IL6R
cadena pesada de anti-4-1BB + ectodominio de PD1 y cadena ligera de anti-4-1BB

Se caracterizaron las proteínas expresadas usando SDS-PAGE y las proteínas de fusión expresadas anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII se purificaron de sobrenadantes de cultivo usando columna de proteína A y los resultados se muestran en la Figura 22. En particular, la masa de la cadena ligera de anti-EGFR1-TGFβRII es más alta y puede ser debido a la presencia de dos sitios de glucosilación en las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Tanto las masas de las cadenas pesadas de anti-HER2/neu-TGFβRII como de anti-EGFR1-TGFβRII son más altas debido a TGFβRII. También la cadena pesada de anti-HER2/neu-TGFβRII tiene cuatro sitios de N-glucosilación, mientras que anti-EGFR1-TGFβRII tiene cinco sitios de N-glucosilación.

Ejemplo 2

Cromatografía en proteína A/SEC. Se analizaron las muestras de anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII por cromatografía en proteína A/SEC y los resultados se muestran en la Figura 23. La Figura 23A muestra un pico afilado de elución de Bmab200 (Herceptin) frente a un pico de elución más ancho que se cree que es una medida de heterogeneidad debido a la presencia de glucosilación ya que existen tres sitios de N-glucosilación adicionales que están presentes en la región de TGFβRII. En particular, el almacenamiento a -80 °C no causó agregación. El desplazamiento en la posición o aspecto del pico claramente en la columna de SEC indica que el aumento en el peso molecular es debido al componente de fusión. Esto confirma nuevamente que la molécula de longitud completa está siendo expresada. La Figura 23B muestra un pico de elución afilado de Bmab200 (Herceptin) frente a un pico de elución más ancho que se cree que es una medida de heterogeneidad debido a la presencia de sitios de glucosilación ya que existen tres sitios de N-glucosilación adicionales presentes en la región de TGFβRII. Nuevamente, el almacenamiento a -80 °C no causó agregación. El desplazamiento en la posición o aspecto del pico pronto en la columna de SEC indica que el aumento en el peso molecular es debido al componente de fusión. Esto confirma nuevamente que la molécula de longitud completa está siendo expresada.

Ejemplo 3

Ensayos funcionales para las proteínas de fusión. Se llevó a cabo experimento de ELISA para comprobar la capacidad de unión de anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII a TGFβ. La Figura 24A muestra que las moléculas anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII se unen a TGFβ, que indica que la proteína de fusión es funcional. La Figura 24B muestra que anti-HER2-TGFβRII inhibe la proliferación de la línea celular BT474 similar a Bmab200 (Herceptin). La Figura 25 muestra que anti-EGFR1-TGFβRII inhibe la proliferación de la línea celular A431 similar a cetuximab.

Ejemplo 4

Se realizó la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ADCC para la proteína de fusión anti-HER2/neu-TGFβRII para determinar que la proteína se unía a los receptores diana sobre las células. Los resultados se muestran en la Figura 26, en la que la actividad se determina en células BT474 y es evidente que la actividad de ADCC (% de lisis de células) de anti-HER2-TGFβRII en células BT474 es similar a la de Bmab200 (Herceptin). La Figura 27 muestra la actividad de ADCC de anti-EGFR1-TGFβRII en células A431, en las que las actividades de ADCC son similares a las de cetuximab. La Figura 28 muestra la actividad de ADCC de actividad de ADCC de anti-EGFR1-4-1BB en comparación con anti-EGFR1-TGFβRII y cetuximab.

Ejemplo 5

Actividad de unión de las proteínas expresadas. El objetivo de este ensayo es probar la funcionalidad de las proteínas de fusión para unirse a los receptores diana en las células en un modo dependiente de la dosis. La Figura 29A muestra que la actividad de unión de anti-CTLA4-TGFβRII a TGFβ1 es comparable a anti-EGFR1-TGFβRII y B muestra la actividad de unión de anti-CTLA4-TGFβRII a CTLA4. La Figura 30A muestra la actividad de unión de anti-CTLA4-TGFβRII para determinar el nivel de unión de PD1-Fc y B muestra la actividad de unión de anti-EGFR1-4-1BB para determinar la unión de 4-1BBL. La Figura 31A muestra la actividad de unión de anti-EGFR1-4-1BB a EGFR y B muestra la actividad de unión de PD1-Fc-4-1BB para encontrar PDL1-Fc. La Figura 32 muestra la actividad de unión de anti-EGFR1-PD1 a EGFR y PD1.

Ejemplo 6

Confirmación de la estructura primaria de molécula. Como se muestra en la Figura 33, las proteínas expresadas se evalúan para determinar el peso molecular y la presencia de glucosilación. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE reductora y no reductora. Las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se separan mediante alquilación por reducción de manera que puedan evaluarse las estructuras reducidas. La digestión triptica de las proteínas de fusión proporciona la identificación de la secuencia primaria. Se realiza análisis de EM/EM de las proteínas.

Análisis de espectrometría de masas de anti-HER2/neu-TGFβRII y anti-EGFR1-TGFβRII. Se expresó la proteína de fusión mostrada en la Figura 1 y se probó. La Figura 34A muestra el espectro de masas espectro de masas de la cadena ligera (LC) (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII y B muestra el espectro de masas deconvolucionado de LC (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII. La Figura 35 muestra el espectro

de masas de la cadena pesada (HC) (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII.

Se expresó y probó la proteína de fusión mostrada en la Figura 2. La Figura 36A muestra el espectro de masas de LC (reducido) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII y B muestra el espectro de masas deconvolucionado de LC (reducido) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII. La Figura 37 muestra el espectro de masas de HC (reducido) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.

Ejemplo 7

Se inspeccionaron las proteínas de fusión que tienen secuencias de aminoácidos como se describen en las Figuras 1 y 2 usando cromatografía de UV y proporcionando cromatogramas resultantes de la separación cromatográfica del digesto triptico de las proteínas de fusión y se probó con UV de 218-222 nm de longitud de onda. También se evaluó la corriente iónica total (TIC) correspondiente a la traza de UV. La Figura 38A muestra el cromatograma de UV de péptidos tripticos de la proteína de fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII y B muestra el cromatograma iónico total (TIC) de péptidos tripticos de la proteína de fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII. Las Figuras 39, 40 y 41 proporcionan listas de péptido triptico esperado/observado de la cadena ligera, cadena pesada y motivo unido de la proteína de fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII, respectivamente. En particular, se identificaron todos los péptidos esperados de las moléculas que incluyen los péptidos de las cadenas ligeras y pesadas y los péptidos del motivo unido (TGFβRII).

La Figura 42A muestra el cromatograma de UV de péptidos tripticos de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII y B muestra el cromatograma iónico total (TIC) de péptidos tripticos de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII. Las Figuras 43, 44 y 45 proporcionan listas de péptido triptico esperado/observado de la cadena ligera, cadena pesada y motivo unido de la proteína de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII, respectivamente. Nuevamente, se identificaron todos los péptidos esperados de las moléculas que incluyen los péptidos de las cadenas ligeras y pesadas y los péptidos del motivo unido (TGFβRII).

Ejemplo 8

La línea de células hospedadoras usada para la expresión de la expresión de proteínas de fusión recombinantes es células CHO o el derivado de células CHO. Las células CHO citadas aquí es cualquier célula Freedom CHO-S; las células CHO-S son células derivadas de CHO adaptadas a cultivo en suspensión sin suero de alta densidad en medio químicamente definido que son capaces de producir altos niveles de proteína recombinante secretada o células CHO K1; que tienen el mismo que ATCC No. CCL-61. Es básicamente una línea de células adherentes. Vectores usados para la línea celular estable:

El vector Freedom pCHO 1.0, diseñado por ProBioGen AG, para expresar uno o dos genes de interés en la dirección 3' de los dos promotores del CMV híbridos diferentes de vector. Este vector contiene el marcador de selección de dihidrofolato reductasa (DHFR) y un gen de resistencia a puromicina, que permite la selección usando MTX y puromicina, simultáneamente.

Se clonan la cadena ligera o las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la proteína de fusión de la cadena ligera en los sitios de enzimas de restricción AvrII y BstZI7 bajo el control del promotor EF2/CMV. Se clonan la cadena pesada o las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la proteína de fusión de la cadena pesada, en sitios de enzimas de restricción EcoRV y Pad bajo el control del promotor CMV/EF1.

La(s) construcción (construcciones) se transfectan en células Freedom CHO-S / células CHOK1. Se selecciona la cepa de células clonales individual altamente productora para producir la proteína de fusión recombinante. Preparar MCB y caracterizar la viabilidad celular, productividad, estabilidad y otros parámetros. Las células se usan para cultivo, seguido de purificación.

Ejemplo 9

El cultivo celular se realiza en modo de lotes alimentados. En el cultivo celular, las células hospedadoras de mamífero usadas es células de ovario de hámster chino (CHO) y el medio de cultivo se suministra inicialmente. Las células CHO son genéticamente manipuladas para producir la proteína de fusión anticuerpo-péptido. Se añade sal de sulfato de cinc heptahidratada al medio a una concentración de 0,4 mM. A diferencia, no existe adición de ninguna sal de cinc en el medio de control. Empieza la serie de fermentación de producción con una cifra inicial de células de $0,3-0,45 \times 10^6$ células/ml a 37 ± 1 °C, los primeros 3-4 días se dedican a cultivar las células en modo discontinuo. La siguiente etapa implica reducir la temperatura a 31 ± 1 °C y continuar la serie hasta el 7° día. El lactato se reduce casi el 10-40 % durante toda la serie. La proteína de fusión producida se recoge entonces de los medios usando la técnica de cromatografía de afinidad.

Ejemplo 10

Se emplea el cultivo celular realizado en un modo de lotes alimentados. En los cultivos celulares, se suministran

inicialmente las células hospedadoras de mamífero y medio de cultivo que es Hyclone CDM4Mab. Las sales (cinc) también se añaden al medio (0,3 mM). Empieza la serie de fermentación de producción con una cifra inicial de células de $0,3-0,45 \times 10^6$ células/ml a 37 ± 1 °C, los primeros 3-4 días se dedican a cultivar las células en modo discontinuo. La siguiente etapa implica reducir la temperatura a 31 ± 1 °C y continuar la serie hasta el 7° día.

5

Ejemplo 11

Purificación de moléculas inmunoestimulantes de fusión anticuerpo-péptido usando columna de proteína A. Se prueba el sobrenadante de cultivo secretado de la línea celular CHO recombinante que contiene los anticuerpos monoclonales de fusión para título y endotoxinas en condiciones estériles. El sobrenadante se somete a cromatografía de afinidad usando resina de afinidad Mab Select Xtra Protein A, se lava y se equilibra con tampón de unión. El pH del sobrenadante se ajusta usando fosfato 0,5 M al mismo pH que la columna; se dejó que el sobrenadante se uniera a la columna / pasara a través de la columna al caudal de 0,5 ml/minuto para lograr la máxima unión. Todas las moléculas de fusión anticuerpo-proteínas se unen mediante la región Fc, mientras que las impurezas se eliminan como flujo a través. La columna se lava con tampón de equilibrio y las moléculas de fusión unidas se eluyen usando glicina 0,1 M a pH 3,0. El pH de las proteínas eluidas se ajusta a pH neutro o el pH de formulación estable y la proteína purificada se almacena a -20 °C o a 2-8 °C.

10

15

Ejemplo 12

20

Diferenciación de trastuzumab de la molécula de fusión de trastuzumab-receptor TGFβRII

Un tumor de cáncer de mama que expresa en exceso el receptor de ErbB2 conducirá o bien por activación constitutiva o heterodimerización con otros miembros de la familia de receptores de ErbB a progresión tumoral. Esto implicará la unión de factores de crecimiento asociados a la vía de señalización de ErbB. Además de esto, el tumor crea un medio en el que el sistema inmunitario es suprimido activando TGFβ y citocinas específicas implicadas en la respuesta inmunitaria suave. Se genera una novedosa molécula en la que trastuzumab (anti-ErbB2) está fusionado con el receptor TGFβRII como una proteína de fusión. Aunque se supone que trastuzumab actuará de recirculación de moléculas dirigidas en las células de cáncer de mama que expresan en exceso ErbB2, el receptor TGFβRII secuestrará TGFβ, conduciendo a activación inmunitaria. El experimento utilizará el crecimiento de líneas celulares que expresan ErbB2 resistentes a Herceptin (seleccionado cultivando células BT474 en presencia de Herceptin) en presencia de TGFβ, células CD8 positivas citotóxicas y células NK. Aunque Trastuzumab será ineficaz en inducir la citotoxicidad, la molécula de fusión trastuzumab-receptor TGFβRII secuestrará TGFβ, previniendo así la inhibición de células CD8 citotóxicas y NK. Esto conducirá a potenciada citotoxicidad observada en las células de fusión trastuzumab-receptor TGFβRII tratadas con respecto a células tratadas con Trastuzumab solo. La lectura para el experimento usará azul de Alamar, un colorante de resazurina que se activará directamente proporcional a las células vivas presentes. Otro método podría ser medir la citotoxicidad usando CytoTox-Glo que mide la liberación de proteasa que se corresponde directamente con células muertas proporcionales. Otro método más podría ser el uso del citómetro de flujo que mide directamente la población de células apoptóticas y necróticas usando Annexin V y yoduro de propidio. Los resultados de estos múltiples experimentos esclarecerán el entendimiento de la actividad de la molécula de conjugado en comparación con trastuzumab solo.

25

30

35

40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biocon Limited
Govindappa, Nagaraj
Sastry, Kedarnath
Soares, Maria Melina

45

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DIRIGIDAS/INMUNOMODULADORAS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LAS MISMAS

50

<130> 014811.795 PCT

<150> 1689/CHE/2012
<151> 30-04-2012

55

<150> 1690/CHE/2012
<151> 30-04-2012

<160> 36

60

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 1

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

10

ES 2 678 696 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

ES 2 678 696 T3

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

ES 2 678 696 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

20

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
 1 5 10 15

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys
 20 25 30

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
 35 40 45

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
 50 55 60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
 65 70 75 80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
 85 90 95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
 100 105 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
 115 120 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 130 135

<210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 5

10

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

ES 2 678 696 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 6
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 678 696 T3

<400> 6

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 7
 <211> 447
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 7

ES 2 678 696 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

ES 2 678 696 T3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val⁻ Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

- <210> 8
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Construcción sintética

<400> 8

10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

ES 2 678 696 T3

	35		40		45														
Ile	Tyr 50	Gly	Ala	Phe	Ser	Arg 55	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro 60	Asp	Arg	Phe	Ser				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr 70	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr 75	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu 80				
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala 85	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln 90	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser 95	Pro				
Trp	Thr	Phe	Gly 100	Gln	Gly	Thr	Lys	Val 105	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr 110	Val	Ala				
Ala	Pro	Ser 115	Val	Phe	Ile	Phe	Pro 120	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln 125	Leu	Lys	Ser				
Gly	Thr 130	Ala	Ser	Val	Val	Cys 135	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe 140	Tyr	Pro	Arg	Glu				
Ala	Lys 145	Val	Gln	Trp	Lys 150	Val	Asp	Asn	Ala	Leu 155	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser 160				
Gln	Glu	Ser	Val	Thr 165	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys 170	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser 175	Leu				
Ser	Ser	Thr	Leu 180	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala 185	Asp	Tyr	Glu	Lys	His 190	Lys	Val				
Tyr	Ala	Cys 195	Glu	Val	Thr	His	Gln 200	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro 205	Val	Thr	Lys				
Ser	Phe 210	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys 215													

<210> 9
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 9

Ala	Cys	Pro	Trp	Ala	Val	Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	
Ala	Ser	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro
			20					25					30		
Ala	Gly	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Val	Ala
		35					40					45			

10

ES 2 678 696 T3

Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
 50 55 60

Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
 65 70 75 80

Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
 85 90 95

Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
 100 105 110

Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
 115 120 125

Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
 130 135 140

Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
 165 170 175

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
 180 185 190

Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 195 200 205

<210> 10
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

10

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

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

ES 2 678 696 T3

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
145 150

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 11

10

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5

<210> 12
<211> 1032
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Construcción sintética

20 <400> 12

gctagcacca agggcccctc cgtgttcct ctggccccct ccagcaagtc cacctctggc 60
ggcaccgccg ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 120
tggaactctg gcgctctgac ctccggcgty cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 180
ggcctgtact cctgtcctc cgtcgtgacc gtgccctcca gctctctggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaacca caagcctcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaacc 300
aagtcttgcg acaagacca cacctgtccc cctgcccctg cccctgagct cctgggaggc 360
cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 420
gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cagcaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 480
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac 540
tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 600

ES 2 678 696 T3

gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatctcc 660
aaggccaagg gccagccccg cgagcctcag gtgtacaccc tgccccctag ccgggaagag 720
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtaaagg gcttctaccc ctccgatatc 780
gccgtggaat gggagtccaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 840
ctggactccg acggctcatt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg 900
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 960
cagaagtccc tgtccctgag cccaggcaaa ggcggaggcg gatctggcgg cggaggatct 1020
ggtggcggat cc 1032

<210> 13
<211> 425
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética

<400> 13

ggatccacca tccccccaca cgtgcagaaa tccgtgaaca acgacatgat cgtgaccgac 60
aacaacggcg ctgtgaagtt cccccagctg tgcaagttct gcgacgtgcg gttctctacc 120
tgcgacaacc agaaatcctg catgtccaac tgctccatca cctccatctg cgagaagccc 180
caggaagtgt gcgtcgccgt ctggcggaag aacgacgaga acatcacctt ggaaaccgtg 240
tgccacgacc ccaagctgcc ctaccacgac ttcctcctgg aagatgccgc ctcccccaag 300
tgcacatga aggaaaagaa gaagcccggc gagactttct tcatgtgcag ctgctcctcc 360
gacgagtgca acgacaacat catcttctcc gaagagtaca acacctcaa ccccgactga 420
agctt 425

<210> 14
15 <211> 430
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Construcción sintética

<400> 14

ES 2 678 696 T3

gcggccgcca tgaacttcgg cctgcggctg atcttcctgg tgctgaccct gaagggcgctg 60
 cagtgcgagg tgcagctggt ggaatccggc ggaggcctgg tccagcctgg cggatctctg 120
 agactgtcct gcgccgcctc cggcttcaac atcaaggaca cctacatcca ctgggtccga 180
 caggcccctg gcaagggcct ggaatgggtg gcccgatct accccaccaa cggctacacc 240
 agatacgccg actccgtgaa gggccgggtc accatctccg ccgacacctc caagaacacc 300
 gcctacctgc agatgaactc cctgcggggc gaggacaccg ccgtgtacta ctgctccaga 360
 tggggaggcg acggcttcta cgccatggac tactggggcc agggcacctt ggtcaccgtg 420
 ctccgctagc 430

5 <210> 15
 <211> 442
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 15

gcggccgcca tggaatccca gaccaggtg ctgatctccc tgctgttctg ggtgtccggc 60
 acctgtggcg acatccagat gaccagctc cctccagcc tgtccgcctc tgtgggagac 120
 agagtgacca tcacctgtcg ggctcccag gacgtgaaca ccgccgtggc ctggtatcag 180
 cagaagcccc gcaaggcccc caagctgctg atctactccg cctccttctt gtactccggc 240
 gtgccctccc ggttctccgg ctctagatcc ggcaccgact ttaccctgac catctccagc 300
 ctgcagcccc aggacttcgc cacctactac tgccagcagc actacaccac cccccccacc 360
 tttggccagg gcaccaagggt ggaaatcaag cggaccgtgg ccgctcctc cgtgttcac 420
 cccaccctcc gacgagcagc tg 442

15 <210> 16
 <211> 1032
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16

ES 2 678 696 T3

gctagcacca agggcccctc cgtgtttccc ctggcccctt ccagcaagtc cacctctggc 60
 ggaccgccc ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 120
 tggaaactctg gcgctctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 180
 ggccctgtact ccctgtcctc cgtcgtgacc gtgccctcca gctctctggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaaccc 300
 aagtccctgcg acaagaccca cacctgtccc ccctgccctg ccctgaact gctgggaggc 360
 ccttccgctgt tctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 420
 gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 480
 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac 540
 tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 600
 gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatctcc 660
 aaggccaagg gccagccccg cgagcctcag gtgtacaccc tgccctccag ccgggacgag 720
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctgggtcaagg gcttctaccc ctccgatatc 780
 gccgtggaat gggagtccaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 840
 ctggactccg acggctcatt ctctctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg 900
 cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 960
 cagaagtccc tgtctctgag ccccgcaaaa ggcggcggag gatctggcgg tggcggatca 1020
 ggcggaggat cc 1032

5 <210> 17
 <211> 427
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 17

gcggccgcca tgaacttcgg cctgcggctg atcttctctg tgctgaccct gaagggcgtg 60
 cagtgccagg tgcagctgaa gcagtccgga cctggcctgg tgcagccttc ccagtccctg 120
 tccatcacct gtaccgtgtc cggcttctcc ctgaccaact acggcgtgca ctgggtccga 180
 cagtccccag gcaagggcct ggaatggctg ggagtgattt ggagcggcgg caacaccgac 240
 tacaacaccc ccttcacctc ccggctgtcc atcaacaagg acaactccaa gtcccagggtg 300
 ttcttcaaga tgaactcctt gcagtccaac gacaccgcca tctactactg cgccagagcc 360
 ctgacctact atgactacga gttcgcctac tggggacagg gcaccctggt caccgtgtct 420
 cgctagc 427

15 <210> 18
 <211> 442
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

5 <400> 18

gcggccgcca	tggaatccca	gacccaggtg	ctgatctccc	tgctgttctg	ggtgtccggc	60
acctgtggcg	acatcctgct	gacccagtcc	cccgtgatcc	tgtccgtgtc	tcctggcgag	120
cgggtgtcct	tctcctgccg	ggcctcccag	tccatcggca	ccaacatcca	ctggtatcag	180
cagcggacca	acggctcccc	tcggctgctg	attaagtacg	cctccgagtc	tatctccggc	240
atccccctcc	ggttctccgg	ctctggctcc	ggcaccgact	tcaccctgtc	catcaactcc	300
gtggaatccg	aggatatcgc	cgactactac	tgccagcaga	acaacaactg	gcccaccacc	360
ttcggcgctg	gcaccaagct	ggaactgaag	cggaccgtgg	ccgctccctc	cgtgttcatc	420
cccaccctcc	gacgagcagc	tg				442

<210> 19
<211> 424
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética

15

<400> 19

gcggccgcca	tgaacttcgg	cctgcggctg	atcttcctgg	tgctgaccct	gaagggcgtg	60
cagtgccagg	tgagctggt	ggaatccggc	ggagggcgtg	tgagcctgg	cagatccctg	120
agactgtcct	gcgccgctc	cggcttcacc	ttctccagct	acaccatgca	ctgggtccga	180
caggccccctg	gcaagggcct	ggaatgggtc	accttcatca	gctacgacgg	caacaacaag	240
tactacgccg	actccgtgaa	gggccggttc	accatctccc	gggacaactc	caagaacacc	300
ctgtacctgc	agatgaactc	cctgcggggc	gaggacaccg	ccatctacta	ctgcgcccgg	360
accggctggc	tgggcccttt	tgattactgg	ggccagggca	ccctggtcac	cgtgtcctcc	420
tagc						424

<210> 20
<211> 445
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Construcción sintética

25

<400> 20

ES 2 678 696 T3

gcggccgcca tggaatccca gacccagggtg ctgatctccc tgctgttctg ggtgtccggc 60
 acctgtggcg agatcgtgct gacccagtc cccggcacc tgtctctgag ccctggcgag 120
 agagccaccc tgtcctgcag agcctcccag tccgtgggct cctcctacct ggcttggtat 180
 cagcagaagc ccggccaggc cctcgggctg ctgatctacg gcgctttctc tcgggccacc 240
 ggcattccctg accggttctc tggctccggc tccggcaccg acttcaccct gaccatctcc 300
 cggctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agtacggctc ctccccctgg 360
 acctttggcc agggcaccaa ggtggaaatc aagcggaccg tggccgctcc ctccgtgttc 420
 cttcccaccc tccgacgagc agctg 445

<210> 21
 <211> 1035
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 21

gctagcacia agggccctag tgtgtttcct ctggctccct cttccaaatc cacttctggt 60
 ggcactgctg ctctgggatg cctgggtgaag gattactttc ctgaacctgt gactgtctca 120
 tggaactctg gtgctctgac ttctgggtgc cacactttcc ctgctgtgct gcagtctagt 180
 ggactgtact ctctgtcatc tgtggtcact gtgcccctctt catctctggg aaccagacc 240
 tacatttgta atgtgaacca caaacatcc aacactaaag tggacaaaaa agccgaaccc 300
 aaatcctgtg acaaaaccca cacctgcccc ccttgtcctg cccctgaact gctgggagga 360
 cttctgtgtt ttctgttccc accaaaacca aaagataccc tgatgatctc tagaacccct 420
 gaggtgacat gtgtgggtgg ggatgtgtct catgaggacc ctgagggtcaa atttaattgg 480
 tacgtcgatg gagtgggaagt ccacaatgcc aaaaccaagc ctagagagga acagtacaat 540
 tcaacctaca gagtcgtcag tgtgctgact gtgctgcac aggattggct gaatggcaag 600
 gaatacaagt gtaaagtctc aaacaaggcc ctgcctgctc caattgagaa aacaatctca 660
 aaggccaagg gacagcctag ggaaccccag gtctacaccc tgccacctc acgagacgaa 720
 ctgacaaaaa accaggtgtc cctgacatgc ctgggtcaaag gcttctaccc ttctgacatt 780
 gctgtggagt gggagtcaaa tggacagcct gagaacaact acaaaacaac cccccctgtg 840
 ctggattctg atggctcttt ctttctgtac tccaaactga ctgtggacaa gtctagatgg 900
 cagcagggga atgtcttttc ttgctctgtc atgcatgagg ctctgcataa cactacact 960
 cagaaatccc tgtctctgtc tcccgggaaa ggcggcggag gatctggcgg aggcgggttct 1020
 ggtggtggcg gatcc 1035

<210> 22
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 22

5
 gcggccgcca tgaatTTTgg actgaggctg atTTTcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
 cagtgtcagg tgcagctgca gcagcctggT gccgagctcg tgaaacctgg cgctccctg 120
 aagatgtcct gcaaggcctc cggctacacc tTcaccagct acaacatgca ctgggtcaag 180
 cagacccccg gcagaggcct ggaatggatc ggcgctatct accccggcaa cggcgacacc 240
 Tcctacaacc agaagTtcaa gggcaaggcc accctgaccg ccgacaagtc ctcttccacc 300
 gcctacatgc agctgtcctc cctgacctcc gaggactccg ccgtgtacta ctgcgcccgg 360
 Tctacctact acggcggcga ctggtactTc aacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc 420
 gtgtctgctg ctagc 435

<210> 23
<211> 405
<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 23

15
 gcggccgcca tgaatTTTgg actgaggctg atTTTcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
 cagtgtcaga Tcgtgctgtc ccagTccccT gccatcctgt ctgctagccc Tggcgagaaa 120
 gtgacaatga cctgcccggc ctctcctcc gtgtcctaca Tccactggtt ccagcagaag 180
 cccggctcca gccccaaaggc Ttgatctac gccacctca acctggcctc Tggcgtgcca 240
 gtgcggTTTT ccggctctgg ctctggcacc Tcctactccc Tgaccatctc Tcgggtggaa 300
 gccgaggatg ccgccaccta ctactgccag cagtggacca gcaaccccc caccattTggc 360
 ggaggcacca agctggaaat caagcggacc gtggcggcgc cctct 405

20
 <210> 24
<211> 631
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 24

ES 2 678 696 T3

ggatccgcct gtccttgggc cgtgtccggc gctagagcct ctccctggctc tgccgcctcc 60
 cccagactga gagagggccc tgagctgtcc cctgacgata ctgccggcct gctggacctg 120
 agacagggca tgtttgccca gctggtggcc cagaacgtgc tgctgatcga cggccccctg 180
 tcctggtact ctgatacctgg cctggccggc gtgtccctga ccggcggact gtcctacaaa 240
 gaggacacca aagaactggt ggtggccaag gctggcgtgt actacgtgtt ctttcagctg 300
 gaactgcggc ggggtggtggc cggcgagggc tctggatctg tgtccctggc cctgcatctg 360
 cagccccctga gatctgccgc tggcgccgct gctctggccc tgacagtgga tctgcctcct 420
 gcctcctccg agggcccgaa ctccgcattc gggtttcagg gccggctgct gcacctgtct 480
 gctggccaga gactgggagt gcatctgcac accgaggcca gagccagaca cgcttggcag 540
 ctgaccaggg gcgctaccgt gctgggacctg ttcagagtga cccccgagat cccagccggc 600
 ctgcccagcc ctagatccga gtgataagct t 631

<210> 25
 <211> 1458
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 25

gcggccgcca tgaatthttgg actgaggctg atthttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
 cagtgtcagg tgcagctgca ggaatctggc cctggactcg tgcggccttc ccaaaccctg 120
 tctctgacct gtaccgtgtc cggctactcc atcacctccg accacgcctg gtcttggggtg 180
 cgacagcctc ctggcagagg cctggaatgg atcggctaca tctcctactc cggcatcacc 240
 acctacaacc ccagcctgaa gtccagagtg accatgctgc gggacacctc caagaaccag 300
 ttctccctgc ggctgtcctc cgtgaccgct gctgataccg ccgtgtacta ctgcgccaga 360
 tctctggcca ggaccaccgc catggattac tggggccagg gctccctcgt gaccgtgtcc 420
 tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cctctggccc ctctctctaa atctacctct 480
 ggcggcaccg ccgctctggg ctgcctcgtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg 540
 tcttggaaact ctggcgcctt gacctccggc gtgcacacct ttccagctgt gctgcagtcc 600

ES 2 678 696 T3

tccggcctgt actccctgtc cagcgtcgtg actgtgccct cctcatctct gggcaccag 660
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaggtggaa 720
 cccaagtccct gcgacaagac ccacacctgt ccccctgtc ctgccctga actgctgggc 780
 ggaccctctg tgttcctgtt cccaccaaaa ccgaaagaca ccctgatgat ctcccggacc 840
 cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat 900
 tggtagctgg acggcgtgga agtgcacaac gccaaagacca agcctagaga ggaacagtac 960
 aactccacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 1020
 aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1080
 tccaaggcca agggccagcc acgggaacct caggtgtaca cactgcccc tagccgcgac 1140
 gagctgacca agaatcaggt gtccctgaca tgccctgtga aaggcttcta cccctccgat 1200
 atcgccgtgg aatgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagac cccccccct 1260
 gtgctggact ccgacggctc attcttctct tactcaaagc tgacagtgga caagtcccgg 1320
 tggcagcagg gcaacgtggt ctctgtctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1380
 acccagaagt cctgtccct gagccccggg aaaggcggcg gaggatctgg cggaggcgg 1440
 tctggtggtg gcggatcc 1458

<210> 26
 <211> 405
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 26

gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttctctg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
 cagtgtgaca tccagatgac ccagtcctcc tccagcctgt ctgcctctgt gggcgacaga 120
 gtgaccatca cctgtcgggc ctcccaggac atctctctct acctgaactg gtatcagcag 180
 aagcccggca agggccccaa gctgctgac tactacacct cccggctgca ctccggcgtg 240
 ccctctagat tttccggctc tggctccggc accgacttta ccttcacat cagctccctg 300
 cagccccagg atatcgccac ctactactgc cagcaaggca acacctgcc ctacacctt 360
 ggccagggca ccaaggtgga aatcaagcgg accgtggcgg cgccc 405

<210> 27
 <211> 1455
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 27

gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttctctg tgctgaccct gaaaggcgtc 60

ES 2 678 696 T3

cagtgtcagg tgcagctgca gcagtgggga gctggactgc tgaagccctc cgagacactg 120
tctctgacct gcgctgtgta cggcggctcc ttctccggct actactggtc ctggattcgg 180
cagtccccctg agaagggcct ggaatggatc ggcgagatca accacggcgg ctacgtgacc 240
tacaacccca gcctggaatc cagagtgacc atctccgtgg acacctcaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgtcctccgt gaccgccgct gataccgccg tgtactactg cgccagagac 360
tacggccccg gcaactacga ctggacttc gacctgtggg gcagaggcac cctcgtgacc 420
gtgtcctctg ctagcaccaa gggccccctc gtgtttcctc tggccccctg ctcaagctcc 480
acctccgaat ctaccgccgc tctgggctgc ctcgtgaagg actacttccc cgagcccctg 540
actgtgtctt ggaactctgg cgccctgacc tccggcgtgc acaccttcc agctgtgctg 600
cagtccctcg gcctgtactc cctgtccagc gtcgtgacag tgccctccag ctctctggggc 660
accaagacct acacctgtaa cgtggaccac aagccctcca acaccaaggt ggacaagcgg 720
gtggaatcta aatacggccc tccctgcctt ccttgcccag cccctgaatt tctgggcgga 780
ccttccgtgt tctgttccc cccaaaacc aaggacacc tgatgatctc ccggaccccc 840
gaagtgacct gcgtgggtgg ggatgtgtcc caggaagatc ccgaggtgca gttcaattgg 900
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagttcaac 960
tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa 1020
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc ctgcccagct ccatcgaaaa gaccatcagc 1080
aaggccaagg gccagccccg ggaaccccag gtgtacacac tgccccaag ccaggaagag 1140
atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctacc ctccgatatc 1200
gccgtggaat gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1260
ctggactccg acggcagctt ctctctgtac tctcgcctga ccgtggacaa gtccccggtg 1320
caggaaggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1380
cagaagtccc tgtccctgtc tctggggaaa ggcggcggag gatctggcgg aggcggttct 1440
ggtggtggcg gatcc 1455

<210> 28
<211> 411
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

10 <400> 28

gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttctctg tgctgacct gaaaggcgtc 60
cagtgtgaga tcgtgctgac ccagtctcct gccacctgt ctctgagccc tggcgagaga 120
gctacctgt cctgccgtgc ctccaatcc gtgtcctctt acctggcctg gtatcagcaa 180
aagcccggcc aggtccccg gctgctgate tacgatgcct ccaatagagc caccggcatc 240
cctgccagat tctccggctc tggctctggc accgacttta cctgaccat ctctctctg 300

gaacccgagg acttcgccgt gtactactgc cagcagcggg ccaactggcc tcccgccctg 360

acatttggcg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcggaccg tggcggcgcc c 411

<210> 29

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 29

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asp Thr Thr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Lys Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

ES 2 678 696 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 30
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 31

<211> 460

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 130 135 140
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 145 150 155 160
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 165 170 175
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 195 200 205
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 210 215 220
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 225 230 235 240

ES 2 678 696 T3

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 325 330 335

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 355 360 365

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 32
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 32

10

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

ES 2 678 696 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr
20 25 30

Val Leu His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Thr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Asn Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val Asn Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asn Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

ES 2 678 696 T3

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Asn His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

- <210> 34
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Construcción sintética

<400> 34

10

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

ES 2 678 696 T3

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Ser Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Pro Arg Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 35
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 35

10

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

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

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

ES 2 678 696 T3

Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ile Cys
 85 90 95
 Gly Arg Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

ES 2 678 696 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 36

10

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

ES 2 678 696 T3

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión quimérica que consiste en un resto de direccionamiento para dirigir a una célula cancerosa, un resto inmunomodulador que contrarresta la tolerancia inmunitaria, y un espaciador de aminoácidos, en la que el resto de direccionamiento y el resto inmunomodulador están unidos por un espaciador de aminoácidos de longitud suficiente de restos de aminoácidos de manera que ambos restos puedan unirse satisfactoriamente a su diana individual, en la que el resto inmunomodulador es TGF- β RII que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; en la que el espaciador de aminoácidos es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:11; y en la que el resto de direccionamiento es anti-EGFR1 que consiste en la cadena pesada SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera SEQ ID NO: 6; 10 en la que SEQ ID NO: 4 está unida mediante el espaciador de aminoácidos al extremo C de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 de anti-EGFR1.
- 15 2. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión quimérica de la reivindicación 1.
3. Una proteína de fusión quimérica según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto.

Proteína de fusión anti-HER2/neu-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-HER2/neu:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP
GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de cadena ligera de anti-HER2/neu:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 1

Proteína de fusión anti-EGFR1-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-EGFR1:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP
GKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKM
NSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de cadena ligera de anti-EGFR1:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGS
PRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYY
CQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECGGGGSGGGGGSGGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGA
VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK
KPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 2

Proteína de fusión anti-CTLA4-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-CTLA4:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQA
PGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ
MNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de cadena ligera de anti-CTLA4:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLA WYQQK
GQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDF AVYYCQQYGSSPWFQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQL KSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKS FNRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNND
MIVTDN NGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQE VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
LEDAASPKCIMK EKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

Figura 3

Proteína de fusión anti-HER2/neu HC-4-1BB y LC-TGF β RII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGSACPWAVSG
ARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL
IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLEL
RRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN
AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR
VTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena ligera-TGF β RII:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI
YSASFLYSGVPSRFRSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPP
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSTIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICE
KPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEK
KKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 4

Proteína de fusión anti-EGFR1 HC-4-1BB y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSGGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYY
CARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGSACPWAVSG
ARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL
IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELWAKAGVYVFFQLEL
RRVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN
AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR
VTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena ligera-TGFβRII:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKY
ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG
AGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVN
NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKP
QEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKK
KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 5

Proteína de fusión anti-CTLA4 HC-4-1BB y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLE
WVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIY
YCARTGWLGPFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGSSACPWAVSGA
RASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNLLI
DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELR
RVWAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA
FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV
TPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena ligera-TGFβRII:

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQ
KSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSI
CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMK
EKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 6

Proteína de fusión anti-HER2/neu HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSPGWFLDSP
DRPWNPPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSN
QTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND
SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPA
GQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena ligera-TGFβRII:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI
YSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSTIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICE
KPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEK
KKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 7

Proteína de fusión anti-EGFR1 HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYY
CARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSPGWFLDSP
DRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWMSPSN
QTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND
SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPA
GQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena ligera-TGFβRII:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKY
ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG
AGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGGSTIPPHVQKSVN
NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKP
QEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKK
KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 8

Proteína de fusión anti-CTLA4 HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

QVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLE
WVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIY
YCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSPGWFLDSPD
RPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQ
TDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDS
GTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAG
QFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena ligera-TGFβRII:

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYGAFSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGGSTIPPHVQ
KSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSI
CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIK
EKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 9

Proteína de fusión anti-HER2/neu HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGGSTIPPHVQK
SVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSIC
EKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEPKSCDKACPWAV
SGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV
LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQL
ELRRVWAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR
NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL
FRVTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI
YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 10

Proteína de fusión anti-EGFR1 HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYY
CARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQK
SVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSIC
EKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEPKSCDKACPWAV
SGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV
LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQL
ELRRVWAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR
NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL
FRVTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKY
ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG
AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 11

Proteína de fusión anti-CTLA4 HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLE
WVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIY
YCARTGWLGPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGSTIPPHVQKSV
**NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK
KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEPKSCDKACPWAVSG
ARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL
IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLEL
RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN
AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR
VTPEIPAGLPSRSE****

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

**EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

Figura 12

Proteína de fusión anti-HER2/neu HC-TGFβRII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-PD1:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQK
SVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSIC
EKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDASPCKIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEPKSCDKPGWFLD
SPDRPWNPPTFSPALLWTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSP
SNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARR
NDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI
YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 13

Proteína de fusión de anti-EGFR1 HC-TGFβRII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-PD1:

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE
WLGVIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYY
CARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQK
SVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSIC
EKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKE
KKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEPKSCDKPGWFLD
SPDRPWNPPPTFSPALLVWTEGD NATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSP
SNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARR
NDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKY
ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY YCQQNNNWPTTFG
AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 14

Proteína de fusión anti-CTLA4 HC-TGFβRII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-PD1:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLE
WVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIY
YCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGGSTIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKK
KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEPKSCDKP *GWFLDSP*
DRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSN
QTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND
SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSRPA
GQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLL
IYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 15

Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada de anti-HER2/neu con conector

1 gctagcacca agggcccctc cgtgtccct ctggcccct ccagcaagtc cacctctggc
 61 ggcaccgccg ctctgggctg cctggtaag gactacttc cggagcccgt gaccgtgtcc
 121 tggaaactctg gcgctctgac ctccggcgtg cacaccttc ctgccgtgct gcagtctcc
 181 ggctgtact ccctgtctc cgtcgtgacc gtgccctcca gctctctgg caccagacc
 241 tacatctgca acgtgaacca caagcccctc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc
 301 aagtctgcg acaagacca cacctgtccccctgccctg cccctgagct cctgggaggc
 361 cctagcgtgt tctgttccc cccaaagccc aaggacacc tgatgatctc ccggaccccc
 421 gaagtgacct gcgtgggtg ggacgtgtcc cagaggacc ctgaagtga gttcaattgg
 481 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac
 541 tccacctacc ggggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa
 601 gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcctgcc ccatcgaaaa gaccatctcc
 661 aaggccaagg gccagccccg cgagcctcag gtgtacacc tgcctctag ccggaagag
 721 atgaccaaga accagggtgtc cctgacctgt ctggtcaagg gcttctacc ctccgatac
 781 gccgtggaat gggagtcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg
 841 ctggactccg acggctcatt ctctctgac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgttg
 901 cagcagggca acgtgtctc ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa cctactacc
 961 cagaagtccc tgcctctgag cccaggcaaa ggcggaggcg gatctggcgg cggaggatct
1021 ggtggcg gatcc

Secuencia de nucleótidos de ECD de TGFβRII:

1 ggatccacca tccccca cgtgcagaaa tccgtgaaca acgacatgat cgtgaccgac
 61 aacaacggcg ctgtgaagt ccccagctg tgcaagttct gcgacgtgcg gttctctacc
 121 tgcgacaacc agaaatcctg catgtccaac tctccatca cctccatctg cgagaagccc
 181 caggaagtgt gcgtgccgt ctggcgggaag aacgacgaga acatcacct ggaaaccgtg
 241 tgccacgacc ccaagctgcc ctaccacgac ttcatctgg aagatgccgc ctccccaaag
 301 tgcacatga aggaaaagaa gaagcccggc gagactttct tcatgtgcag ctgctctcc
 361 gacgagtgca acgacaacat catctctcc gaagagtaca acacctcaa ccccgactga
 421 agctt

Figura 16

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de anti-HER2/neu:

```

1 gcggccgcca tgaacttcgg cctgcggtg atcttctctg tgetgaccct gaagggcgtg
61 cagtgcgagg tgcagctggt ggaatccggc ggaggcctgg tccagcctgg cggatctctg
121 agactgtcct gcgcccctc cggcttcaac atcaaggaca cctacatcca ctgggtccga
181 caggccccctg gcaagggcct ggaatgggtg gcccgatct accccaccaa cggctacacc
241 agatacgcg actccgtgaa gggccgggtc accatctccg ccgacacctc caagaacacc
301 gcctacctgc agatgaactc cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgctccaga
361 tggggaggcg acggcttcta cggcatggac tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg
421 ctccgcta gc

```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-HER2/neu:

```

1 gcggccgcca tggaaatcca gaccaggtg ctgatctccc tgetgttctg ggtgtccggc
61 acctgtggcg acateccagat gaccagctcc cctccagcc tgtccgcctc tgtggggcag
121 agagtgacca tcacctgtcg ggcctcccag gacgtgaaca ccgccgtggc ctggatcag
181 cagaagcccg gcaaggcccc caagctgtg atctactccg cctccttct gtactccggc
241 gtgccctccc ggttctcccg ctctagatcc ggcaccgact ttaccctgac catctccagc
301 ctgcagcccg aggacttgc cacctactac tgccagcagc actacaccac cccccccacc
361 tttggccagg gcaccaagg ggaatcaag cggaccgtg ccgctccctc cgtgttcatc
421 cccacct ccgacgagca gctg

```

Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada de anti-EGFR1 con conector:

```

1 gctagcacca agggcccctc cgtgtttccc ctggccccct ccagcaagtc cacctctggc
61 ggcaccgccc ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc
121 tggaaactctg gcgctctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgcccgtgt gcagtctcc
181 ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgacc gtgccctcca gctctctggg caccagacc
241 tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaacc
301 aagtccctgcg acaagacca cacctgtccc ccctgccctg ccctgaact gctgggaggc
361 ccttccgtgt tctgttccc cccaaagccc aaggacacce tgatgatctc ccggacccc
421 gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cagcaggacc ctgaagtga gttcaattgg
481 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac
541 tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa
601 gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gacctctcc
661 aaggccaag gccagccccg cgagcctcag gtgtacaccc tgctcccag ccgggacgag
721 ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctgggtcaagg gcttctaccc ctccgatata
781 gccgtggaat gggagtccaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg
841 ctggactccg acggctcatt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg
901 cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa cactacacc
961 cagaagtccc tgtctctgag ccccggcaaa ggcggcggag gatctggcgg tggcggatca
1021 ggcggag gatcc

```

Figura 17

ES 2 678 696 T3

Secuencia de nucleótidos de región variable de la cadena pesada de anti-EGFR1:

```
1 ggggcccga tgaacttcgg cctgcccgtg atcttctgg tgctgacct gaagggcgtg
61 cagtgccagg tgcagctgaa gcagtccgga cctggcctgg tgcagccttc ccagtccctg
121 tccatcacct gtaccgtgtc cggtttctcc ctgaccaact acggcgtgca ctgggtccga
181 cagtccccag gcaagggcct ggaatggctg ggagtgattt ggagcggcgg caacaccgac
241 tacaacaccc ccttcacctc ccggctgtcc atcaacaagg acaactccaa gtcccagggtg
301 ttcttcaaga tgaactccct gcagtccaac gacaccgcca tctactactg cgcagagacc
361 ctgacctact atgactacga gttcgcctac tggggacagg gcaccctggt caccgtgtct
421 cgctagc
```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-EGFR1:

```
1 ggggcccga tggaaatcca gaccaggtg ctgatctccc tgctgttctg ggtgtccggc
61 acctgtggcg acatcctgct gaccagctcc cccgtgatcc tgtccgtgtc tctggcgag
121 cgggtgtcct tctcctgccg ggctcccag tccatcggca ccaacatcca ctggtatcag
181 cagcggacca acggctcccc tcggctgtctg attaagtacg cctccgagtc tatctccggc
241 atccccctcc ggttctccgg ctctggctcc ggcaccgact tcaccctgtc catcaactcc
301 gtggaatccg aggatatcgc cgactactac tgccagcaga acaacaactg gccaccacc
361 ttcggcgtg gcaccaagct ggaactgaag cggaccgtgg ccgctccctc cgtgttcac
421 cccaccct ccgacgagca gctg
```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de anti-CTLA4:

```
1 ggggcccga tgaacttcgg cctgcccgtg atcttctgg tgctgacct gaagggcgtg
61 cagtgccagg tgcagctggt ggaatccggc ggagggcgtg tgcagccttc ccagtccctg
121 agactgtcct gcgccgctc cggtttcacc ttctccagct acaccatgca ctgggtccga
181 caggccccctg gcaagggcct ggaatggctg accttcatca gctacgacgg caacaacaag
241 tactacgccg actccgtgaa gggccggttc accatctccc gggacaactc caagaacacc
301 ctgtacctgc agatgaactc cctgcccggc gaggacaccg ccatctacta ctgcgcccg
361 accggtggc tgggcccttt tgattactgg ggccagggca ccctggtcac cgtgtcctcc
421 tagc
```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-CTLA4:

```
1 ggggcccga tggaaatcca gaccaggtg ctgatctccc tgctgttctg ggtgtccggc
61 acctgtggcg agatcgtgct gaccagctcc cccggcacc tgtctctgag cctggcgag
121 agagccaccc tgtcctgcag agcctcccag tccgtgggtt cctcctacct ggcttggat
181 cagcagaagc ccggccaggc ccctcggctg ctgatctacg gcgtttctc tcgggccacc
241 ggcattccctg accggttctc tggtcccggc tccggcaccg acttcaccct gaccatctcc
301 cggctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agtacggctc ctccccctg
361 acctttggc agggaccaa ggtggaatc aagcggaccg tggccgctcc ctccgtgttc
421 ctccccac cctccgacga gcagctg
```

Figura 18

ES 2 678 696 T3

Secuencia de nucleótidos de la molécula IgG1 anti-CD20:

```
1 gctagcacia agggccctag tgtgtttcct ctggctcct cttccaaatc cacttctggt
61 ggcactgctg ctctgggatg cctggtgaag gattactttc ctgaacctgt gactgtctca
121 tggaaactctg gtgctctgac ttctgggtgc cacactttcc ctgctgtgct gcagtctagt
181 ggactgtact ctctgtcatc tgtggtcact gtgccctctt catctctggg aaccagacc
241 tacatthtga atgtgaacca caaacctacc aacctaaag tggacaaaaa agccgaacct
301 aaatcctgtg aaaaaacca cacctgcccc ccttgtcctg cccctgaact gctgggagga
361 ccttctgtgt ttctgttccc accaaaacca aaagataccc tgatgatctc tagaaccctc
421 gaggtgacat gtgtggtggt ggatgtgtct catgaggacc ctgaggtcaa atttaattgg
481 tacgtcgatg gagtggaggt ccacaatgcc aaaaccaagc ctagagagga acagtacaat
541 tcaacctaca gagtgcgtag tgtgtgact gtgctgcatc aggattggct gaatggcaag
601 gaatacaagt gtaaagtctc aaacaaggcc ctgctgctc caattgagaa aacaatctca
661 aaggccaagg gacagcctag ggaacccag gtctacaccc tgccaccttc acgcgacgaa
721 ctgacaaaaa accaggtgtc cctgacatgc ctggtcaaaag gcttctaccc ttctgacatt
781 gctgtggagt gggagtcaaa tggacagcct gagaacaact acaaaacaac cccccctgtg
841 ctggattctg atggctcttt ctttctgtac tccaaactga ctgtggacaa gtctagatgg
901 cagcagggga atgtcttttc ttgtctgtgc atgcatgagg ctctgcataa ccactacact
961 cagaaatccc tgtctctgtc tcccgggaaa ggcgcgagg gatctggcgg agggggttct
1021 ggtggtggcg gatcc
```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de anti-CD20:

```
1 gcggccgcca tgaatthtgg actgaggctg atthtctgg tgctgacct gaaaggcgtc
61 cagtgtcagg tgcagctgca gcagcctggt gccgagctcg tgaacctgg cgcctccgtg
121 aagatgtcct gcaaggcctc cggctacacc ttcaccagct acaacatgca ctgggtcaag
181 cagacccccg gcagaggcct ggaatggatc ggcgctatct accccgcaa cggcgacacc
241 tctacaacc agaagtthca gggcaaggcc acctgaccg ccgacaagtc ctctccacc
301 gctacatgc agtgtctctc cctgacctcc gaggactcgg ccgtgtacta ctgcccggg
361 tctacctact acggcggcga ctggtacttc aacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc
421 gtgtctgctg ctagc
```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-CD20:

```
1 gcggccgcca tgaatthtgg actgaggctg atthtctgg tgctgacct gaaaggcgtc
61 cagtgtcaga tcgtgctgtc ccagtcacct gccatcctgt ctgctagccc tggcgagaaa
121 gtgacaatga cctgcccggc ctctctctcc gtgtctctca tccactggtt ccagcagaag
181 cccggtctca gcccgaagcc ttggatctac gccacctca acctggcctc tggcggtgcca
241 gtgcggtttt ccggtctggt ctctggcacc tctactccc tgacctctc tcgggtggaa
301 gccgaggatg ccgccacctc ctactgccag cagtggacca gcaaccccc cacatthtggc
361 ggaggcacca agctggaaat caagcggacc gtggcgcgcc cctct
```

Figura 19

Secuencia de nucleótidos de 4-1BB:

```

1  ggatccgcct  gtccttgggc  cgtgtccggc  gctagagcct  ctccctggctc  tgccgcctcc
61  cccagactga  gagagggccc  tgagctgtcc  cctgacgatc  ctgccggcct  gctggacctg
121  agacagggca  tgtttgcca  gctgggtggc  cagaacgtgc  tgctgatcga  cggccccctg
181  tcctggtact  ctgatcctgg  cctggccggc  gtgtccctga  ccggcggact  gtccatacaa
241  gaggacacca  aagaactggt  ggtggccaag  gctggcgtgt  actacgtgtt  ctttcagctg
301  gaactgcggc  ggggtgtggc  cggcgagggc  tctggatctg  tgccctggc  cctgcatctg
361  cagccccga  gatctgccgc  tggcgccgct  gctctggccc  tgacagtgga  tctgcctcct
421  gcctcctccg  aggcccgaa  ctccgcattc  gggtttcagg  gccggctgct  gcacctgtct
481  gctggccaga  gactgggagt  gcatctgcac  accgaggcca  gagccagaca  cgcctggcag
541  ctgaccaggg  gcgctaccgt  gctgggcctg  ttcagagtga  cccccgagat  cccagccggc
601  ctgcccagcc  ctagatccga  gtgataagct  t

```

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de anti-IL6R:

```

1  ggggccgcca  tgaattttgg  actgaggctg  attttctctg  tgctgacct  gaaaggcgtc
61  cagtgtcagg  tgcagctgca  ggaatctggc  cctggactcg  tgcggccttc  ccaaaccctg
121  tctctgacct  gtaccgtgtc  cggctactcc  atcacctccg  accacgcctg  gtcttgggtg
181  cgacagcctc  ctggcagagg  cctggaatgg  atcggctaca  tctcctactc  cggcatcacc
241  acctacaacc  ccagcctgaa  gtccagagtg  accatgctgc  gggacacctc  caagaaccag
301  ttctcctcgc  ggctgtcctc  cgtgaccgct  gctgataccg  ccgtgtacta  ctgcccaga
361  tctctggcca  ggaccaccgc  catggattac  tggggccagg  gctccctcgt  gaccgtgtcc
421  tctgctagca  ccaagggccc  ctccgtgttc  cctctggccc  ctctctctaa  atctacctct
481  ggcggcaccg  ccgctctggg  ctgcctcgtg  aaggactact  tccccgagcc  cgtgacagtg
541  tcttggaaact  ctggcgcct  gacctccggc  gtgcacacct  tccagctgt  gctgacgtcc
601  tccggcctgt  actcctgtc  cagcgtcgtg  actgtgccct  cctcatctct  gggcaccag
661  acctacatct  gcaacgtgaa  ccacaagccc  tccaacacca  aggtggacaa  gaaggtggaa
721  cccaagtctc  gcgacaagac  ccacacctgt  cccccttgtc  ctgcccctga  actgctgggc
781  ggaccctctg  tgttcctgtt  cccaccaaaa  ccgaaagaca  ccctgatgat  ctcccggacc
841  cccgaagtga  cctgcgtggt  ggtggatgtg  tcccacgagg  accctgaagt  gaagttcaat
901  tggtagctgg  acggcgtgga  agtgacaac  gccaaagaca  agcctagaga  ggaacagtac
961  aactccacct  accgggtggt  gtccgtgctg  accgtgctgc  accaggattg  gctgaacggc
1021  aaagagtaca  agtgcaaggt  gtccaacaag  gccctgctg  cccccatcga  aaagaccatc
1081  tccaaggcca  agggccagcc  acgggaacc  cagggtgtaca  cactgcccc  tagccgcgac
1141  gagctgacca  agaatcaggt  gtccctgaca  tgctcctgta  aaggcttcta  cccctccgat
1201  atcgcctggt  aatgggagtc  caacggccag  cctgagaaca  actacaagac  cccccccct
1261  gtgctggact  ccgacggctc  attcttctct  tactcaaagc  tgacagtgga  caagtcccgg
1321  tggcagcagg  gcaacgtgtt  ctctgtctcc  gtgatgcacg  aggcctgca  caaccactac
1381  acccagaagt  cctgtccct  gagccccggg  aaaggcggcg  gaggatctgg  cggaggcggg
1441  tctggtggtg  gcggatcc

```

Figura 20

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-IL6R:

```

1 gcggccgcca tgaatthttgg actgaggctg atthttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc
61 cagtgtgaca tccagatgac ccagtcctcc tccagcctgt ctgcctctgt gggcgacaga
121 gtgaccatca cctgtcgggc ctcccaggac atctcctcct acctgaactg gtatcagcag
181 aagcccggca agggcccaaa gctgctgac tactacacct cccggctgca ctccggcgtg
241 ccctctagat thttccggctc tggctccggc accgacttta ccttcacat cagctccctg
301 cagcccaggg atatacggac ctactactgc cagcaaggca acaccctgcc ctacaccttt
361 ggccagggca ccaaggtgga aatcaagcgg accgtggcgg cgccc

```

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de anti-4-1BB

```

1 gcggccgcca tgaatthttgg actgaggetg atthttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc
61 cagtgtcagg tgcagctgca gcagtgggga gctggactgc tgaagccctc cgagacactg
121 tctctgacct gcgctgtgta cggcggctcc thttccggct actactggtc ctggattcgg
181 cagtcccctg agaaggcct ggaatggatc ggcgagatca accacggcgg ctactgacc
241 tacaaccca gctggaatc cagagtgacc atctcctgg acacctcaa gaaccagttc
301 tccctgaagc tgcctccgt gaccgcccgt gataccgccc tgtactactg cgccagagac
361 tacggcctg gcaactacga ctggtacttc gacctgtggg gcagaggcac cctcgtgacc
421 gtgtcctctg ctagcaccaa gggcccctcc gtgtttcctc tggccccttg ctacgctcc
481 acctccgaat ctaccgccc tctgggtgct ctcgtgaagg actacttccc cgagcccgtg
541 actgtgtctt ggaactctgg cggcctgacc tccggcgtgc acacctttcc agctgtgctg
601 cagtccctcc gcctgtact cctgtccagc gtcgtgacag tgcctccag ctctctgggc
661 accaagacct acacctgtaa cgtggaccac aagccctcca acaccaaggt ggacaagcgg
721 gtggaateta aatacggccc tccctgccct ccttgcccag ccctgaatt tctgggcgga
781 ccttccgtgt tccctgtccc cccaaaacc aaggacacc tgatgatctc ccggaccccc
841 gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc caggaagatc ccgaggtgca gttcaattgg
901 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagttcaac
961 tccactacc ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggattggct gaaccggcaa
1021 gagtacaagt gcaaggtgct caacaagggc ctgccagct ccatcgaaaa gaccatcagc
1081 aaggccaagg gccagccccg ggaaccccag gtgtacacac tgctccaag ccaggaagag
1141 atgaccaaga atcaggtgct cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctacc ctccgatatc
1201 gccgtggaat gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg
1261 ctggactccg accgcagctt ctctctgtac tctcgcctga ccgtggacaa gtcccgggtg
1321 caggaaggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccaactaccc
1381 cagaagtccc tgtccctgtc tctggggaaa ggcggcggag gatctggcgg aggcgggtctc
1441 ggtggtggcg gatcc

```

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de anti-4-1BB

```

1 gcggccgcca tgaatthttgg actgaggctg atthttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc
61 cagtgtgaga tctgtctgac ccagttcctc gccaccctgt ctctgagccc tggcgagaga
121 gctacctgt cctgcccgtc ctcccattcc gtgtcctctt acctggcctg gtatcagcaa
181 aagcccggcc aggtccccg gctgctgac tactatgcct ccaatagagc caccggcctc
241 cctgccagat tctccggctc tggctctggc accgacttta cctgacct ctctctctg
301 gaacccaggg acttccgctg gtactactgc cagcagcgg ccaactggcc tcccgcctg
361 acatthggcg gaggcaccaa ggtggaatc aagcggaccg tggcggcgc c

```

Figura 21

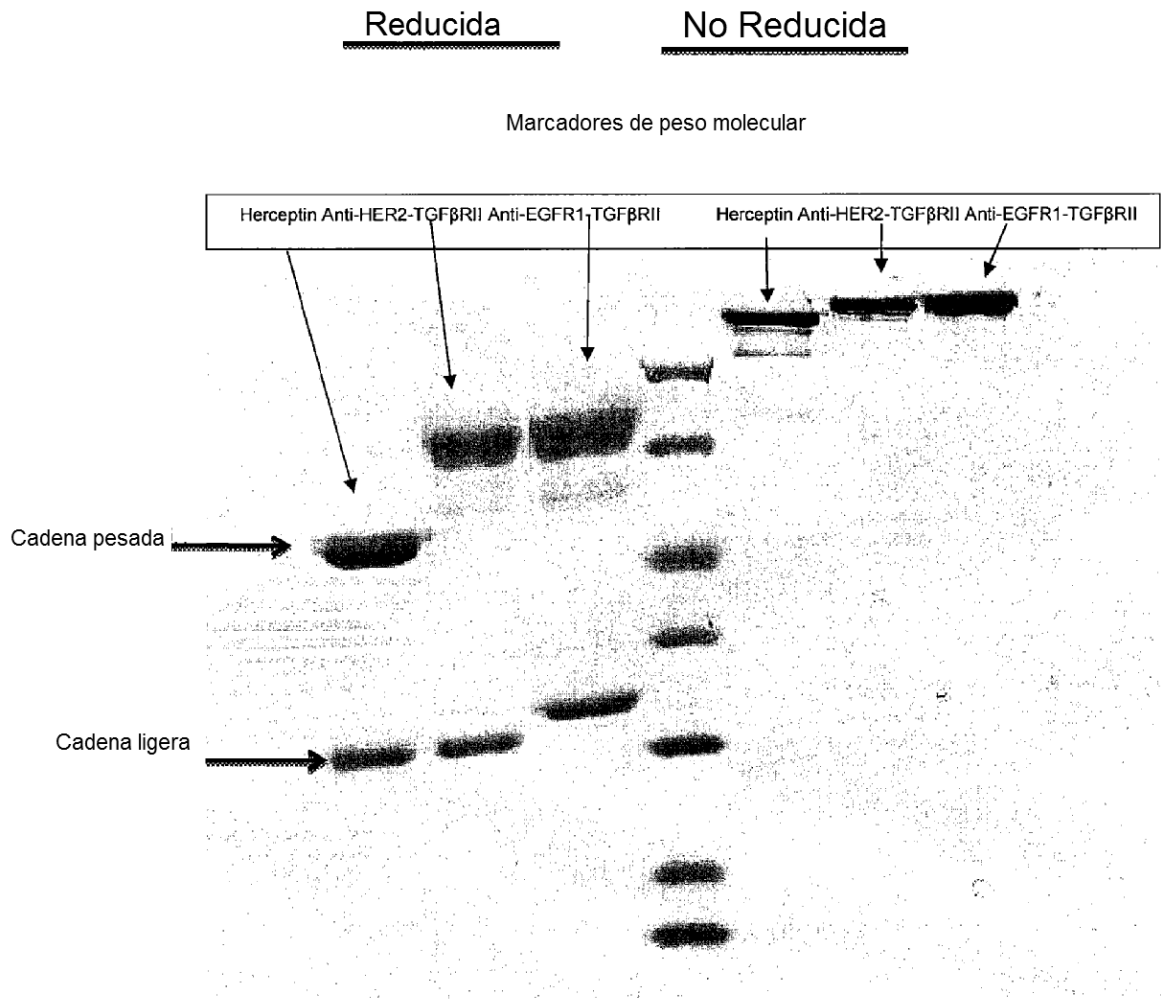


Figura 22

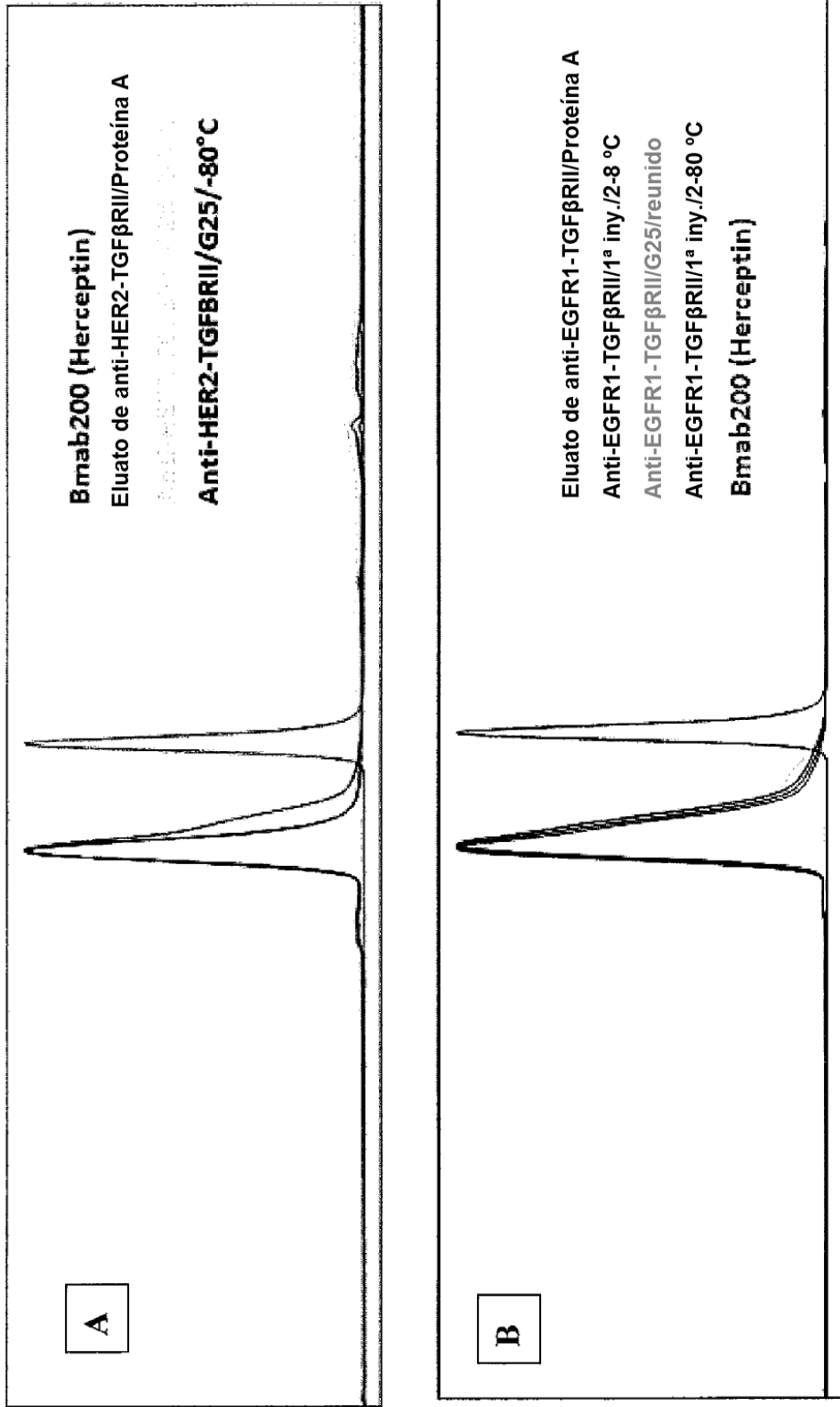
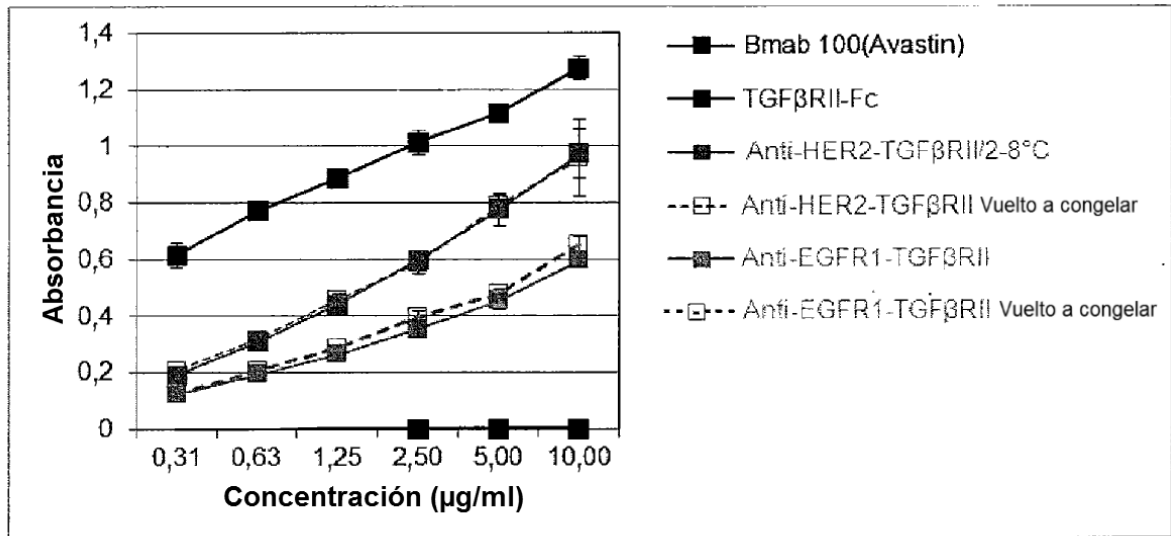


Figura 23

A



B

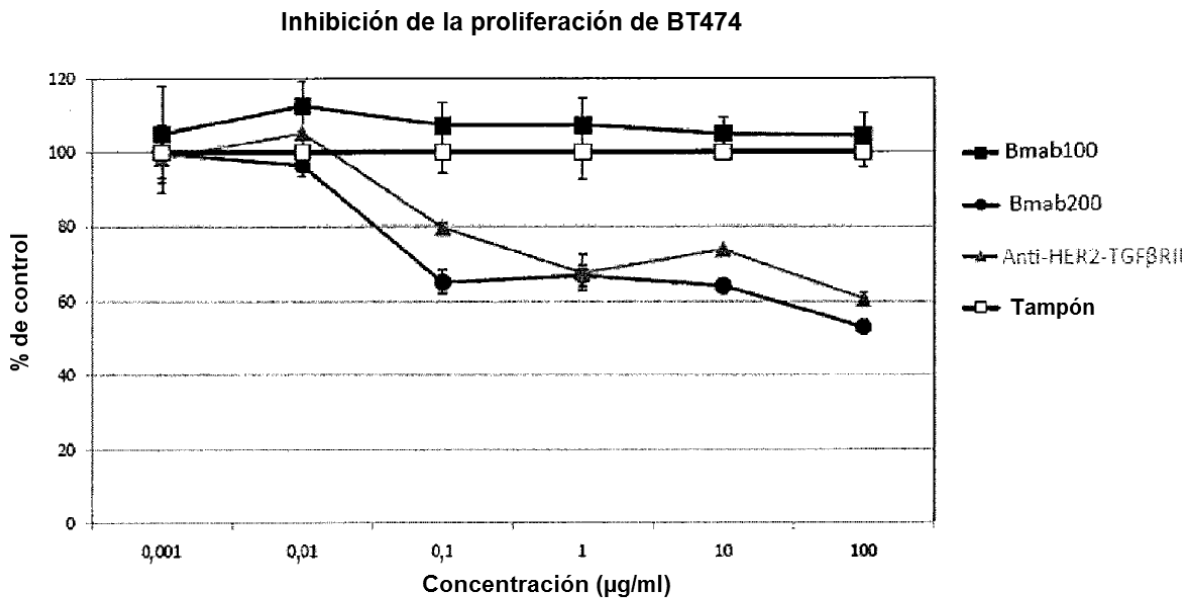


Figura 24

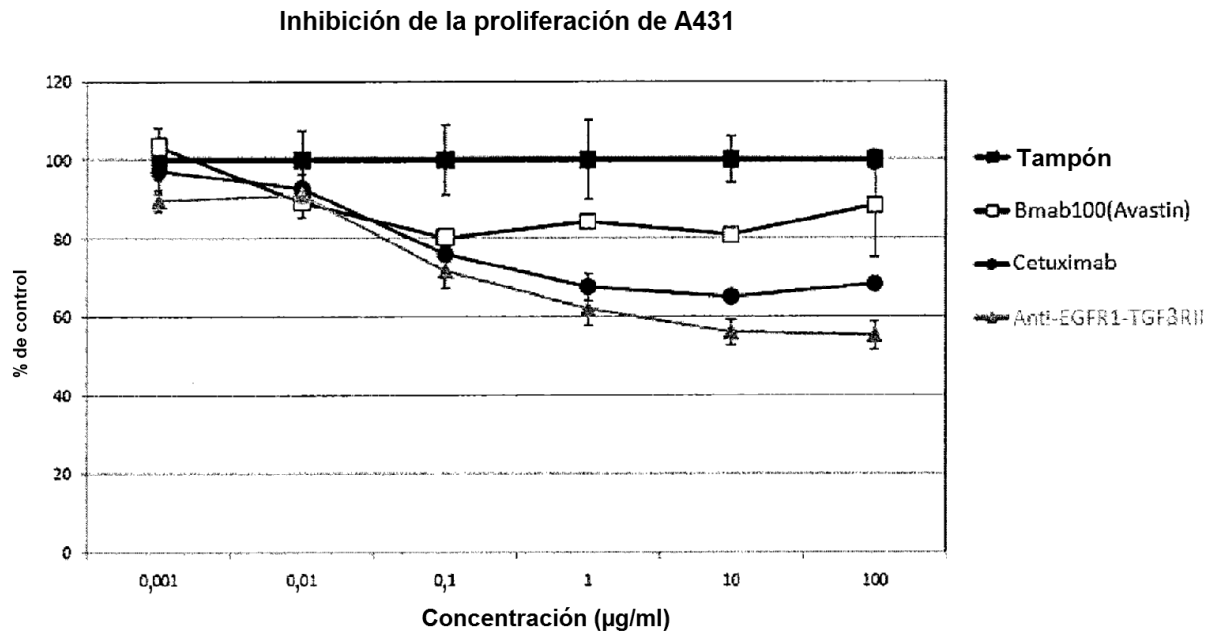
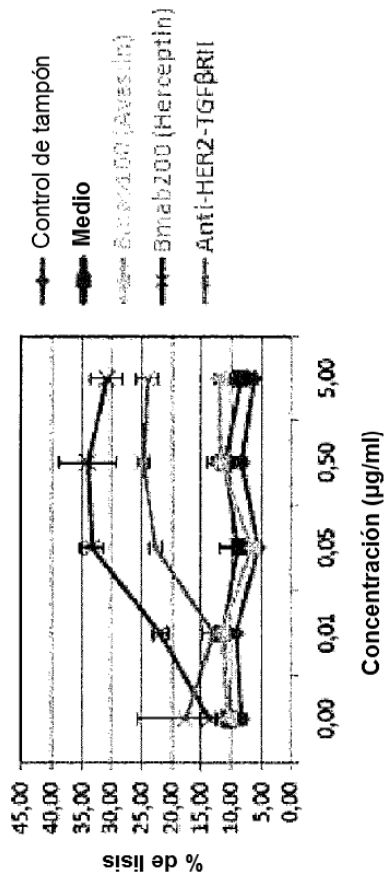


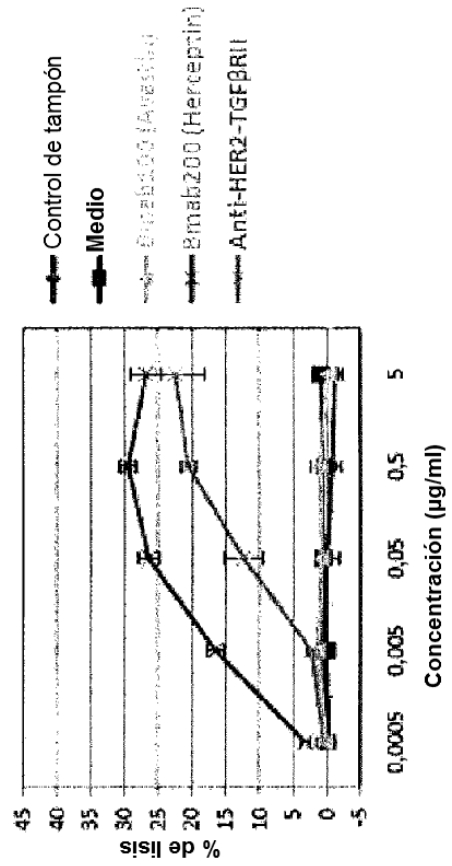
Figura 25

Actividad de ADCC de anti-HER2-TGFβRII en células BT474

BT474 (relación 50:1 de E:T)



BT474 (relación 12:1 de E:T)



BT474 (relación 25:1 de E:T)

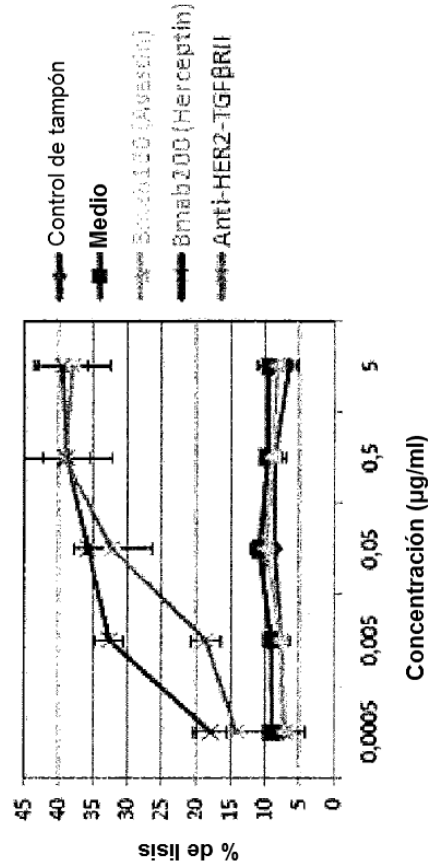


Figura 26

Actividad de ADCC de anti-EGFR1-TGFβRII en células A431

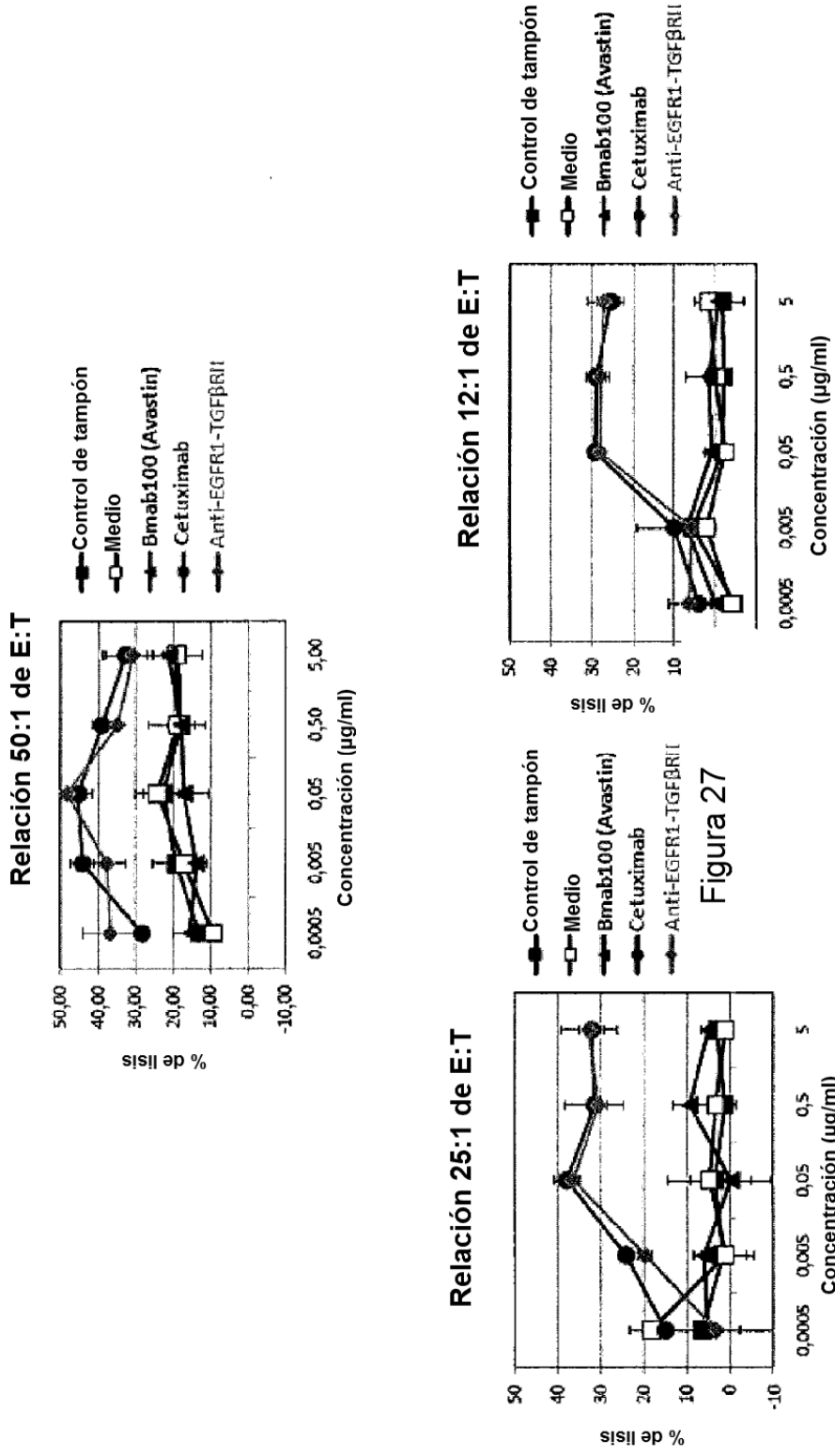


FIGURA 27

Ensayo de ADCC de anti-EGFR1-4-1BB 29112011

E:T:: 10:1

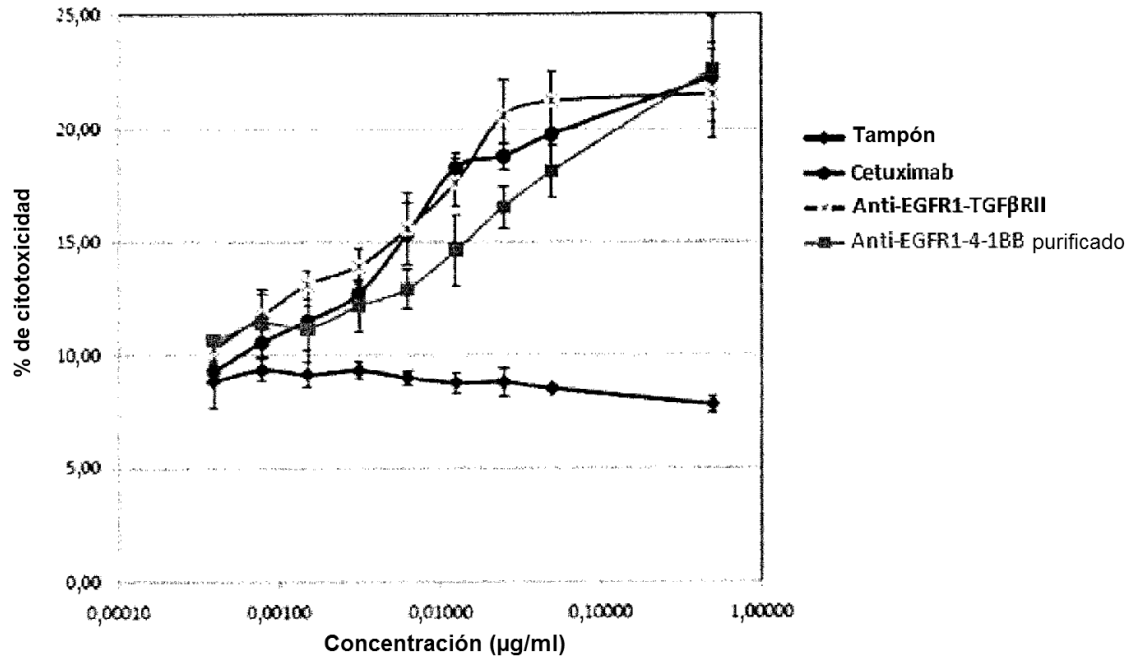


Figura 28

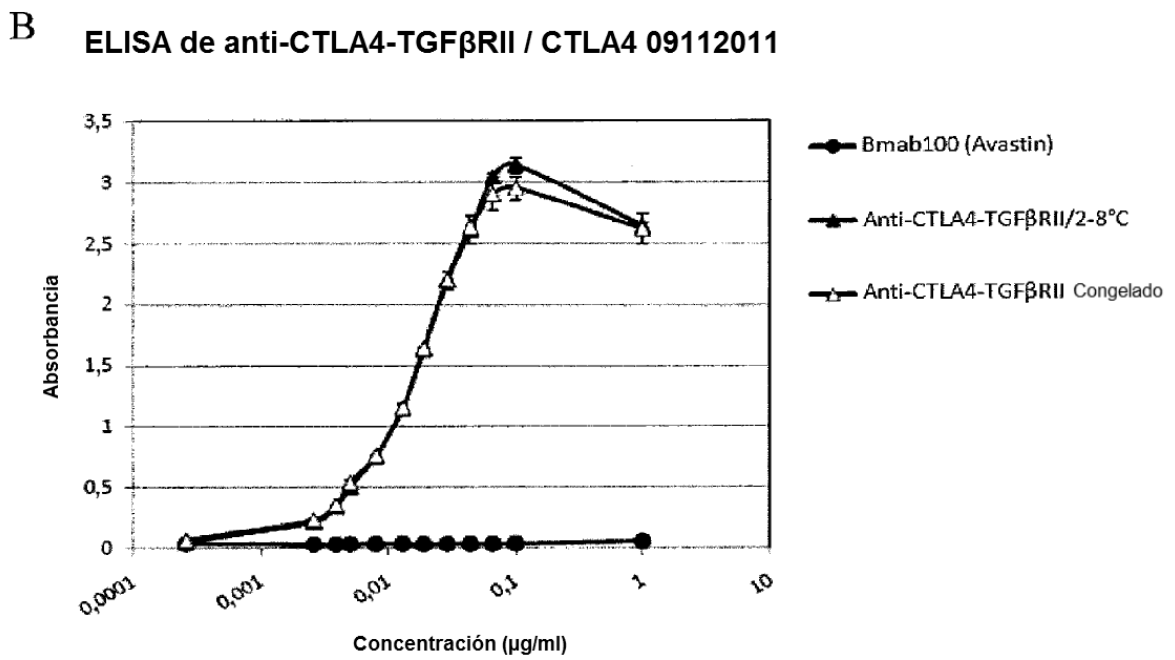
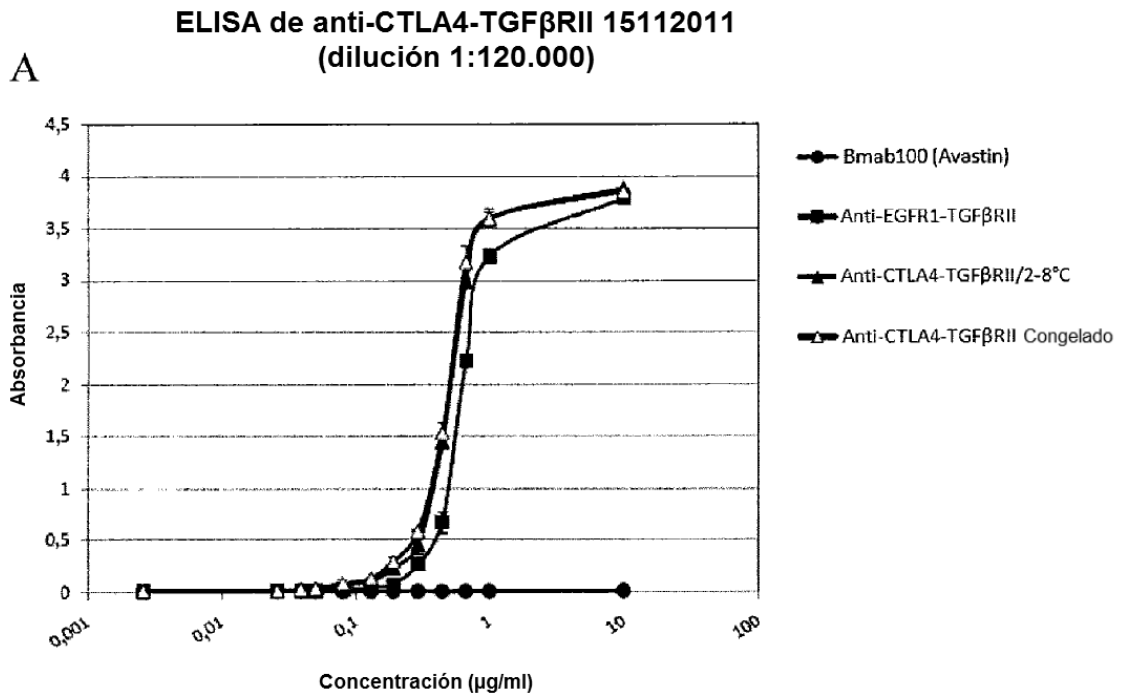


Figura 29

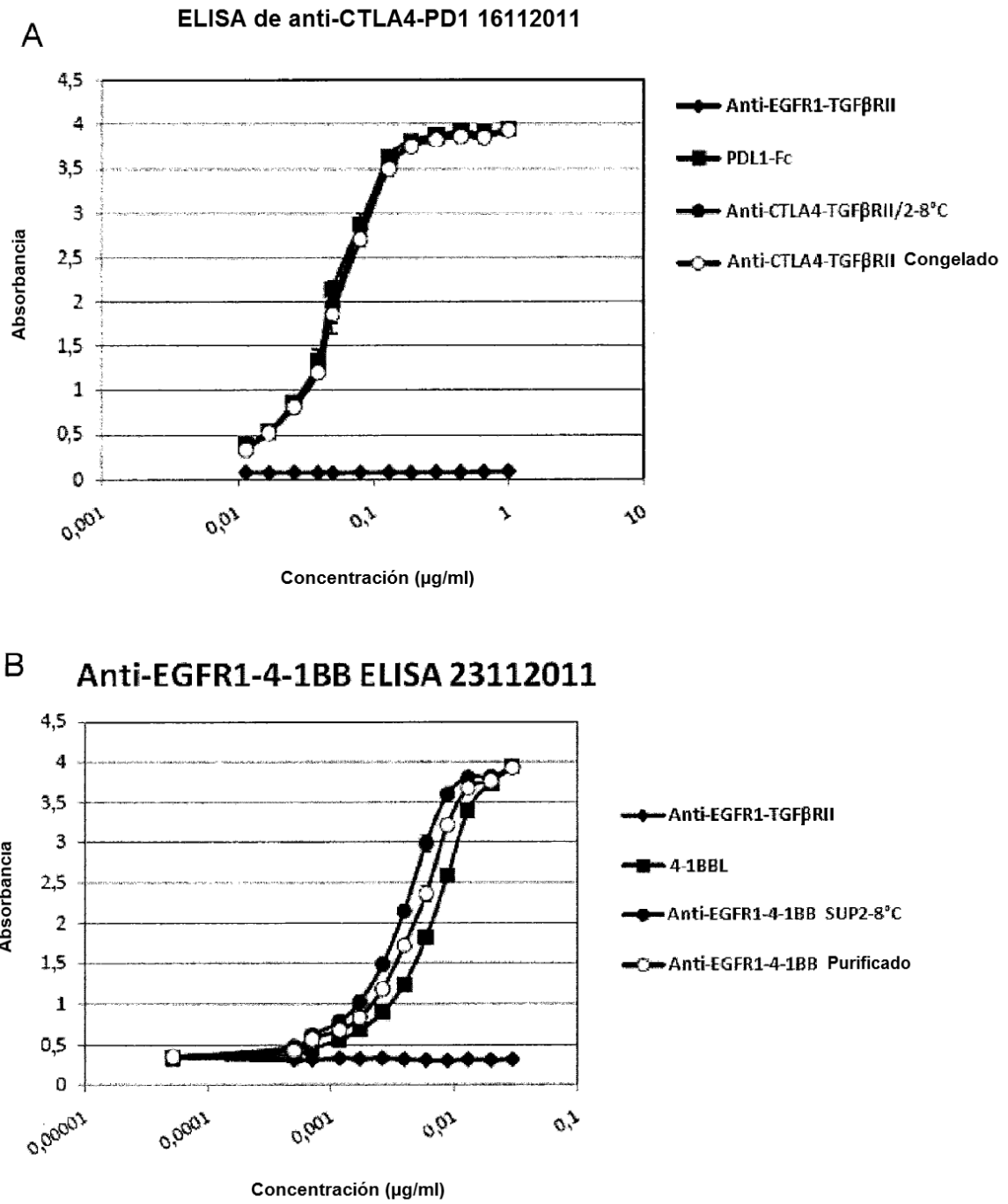


Figura 30

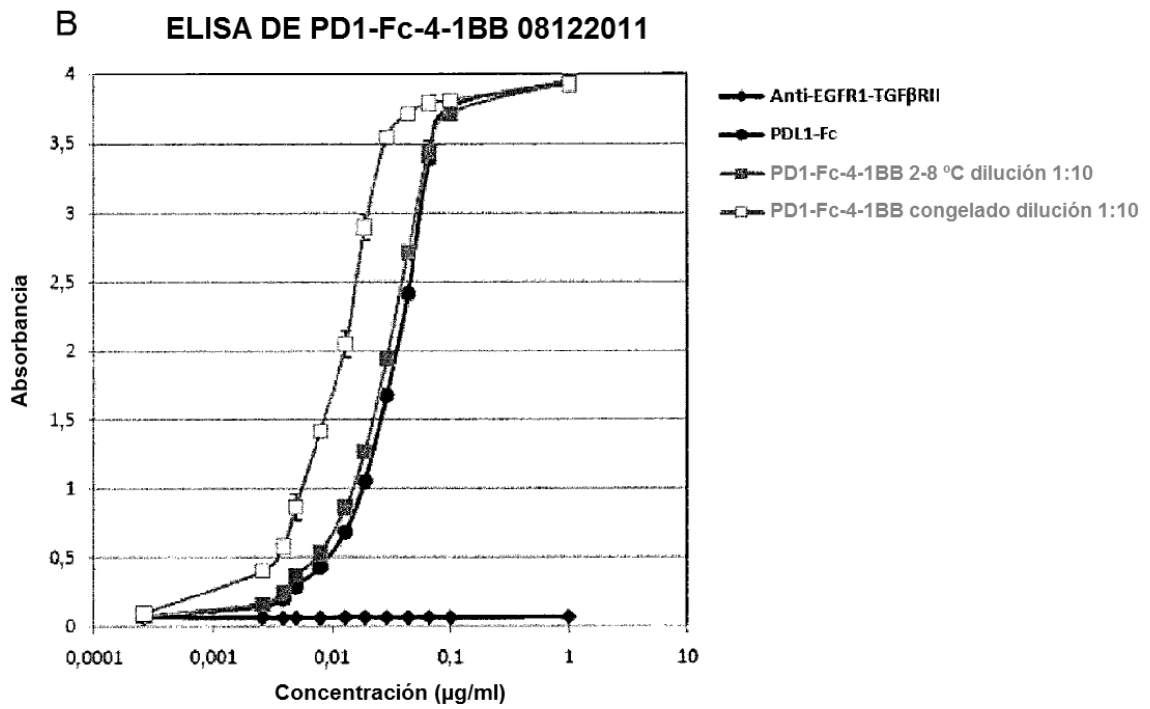
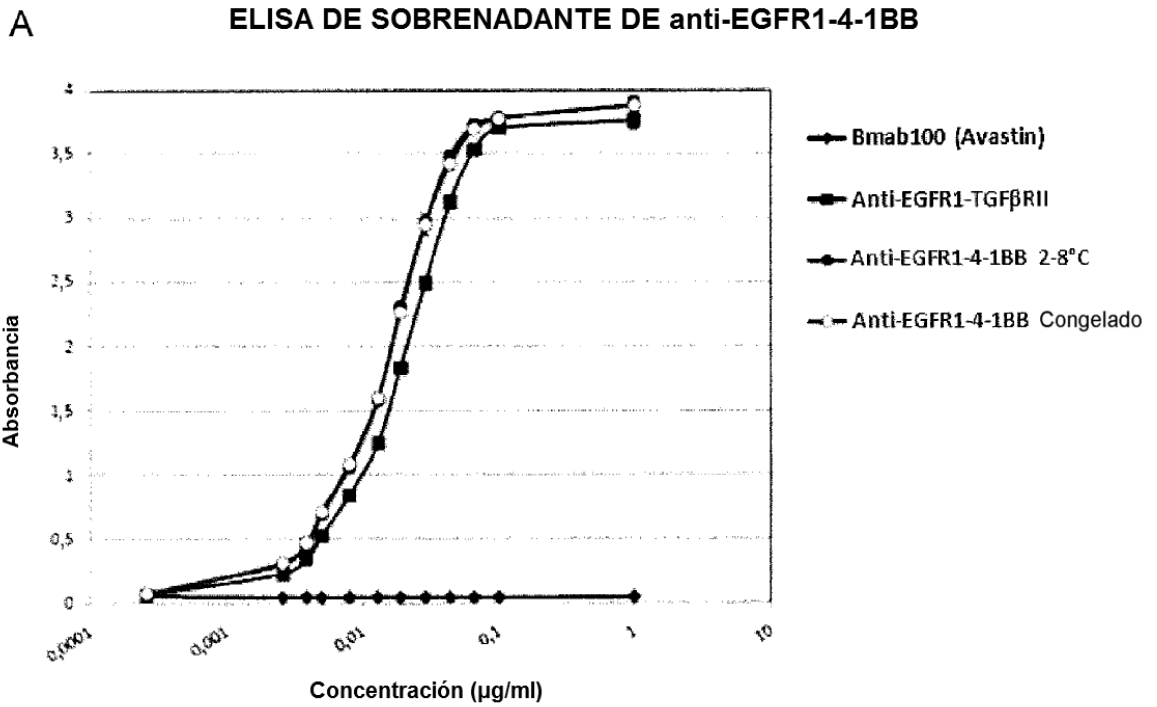


Figura 31

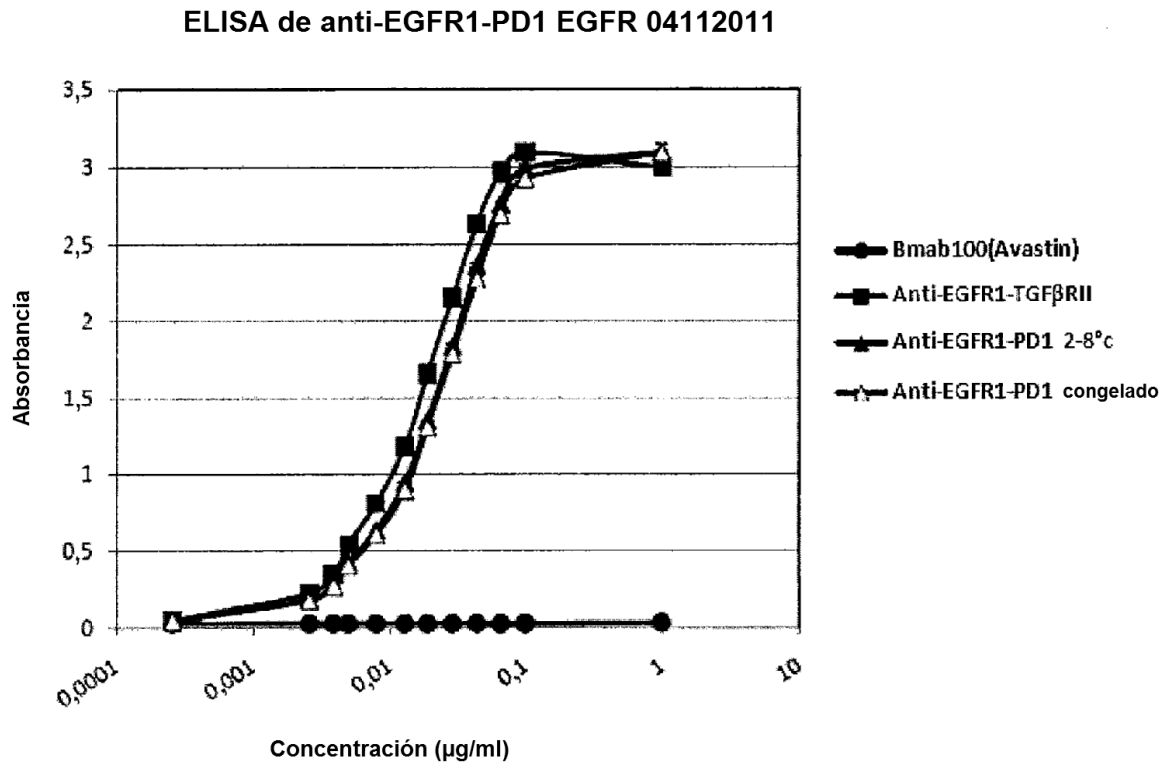


Figura 32

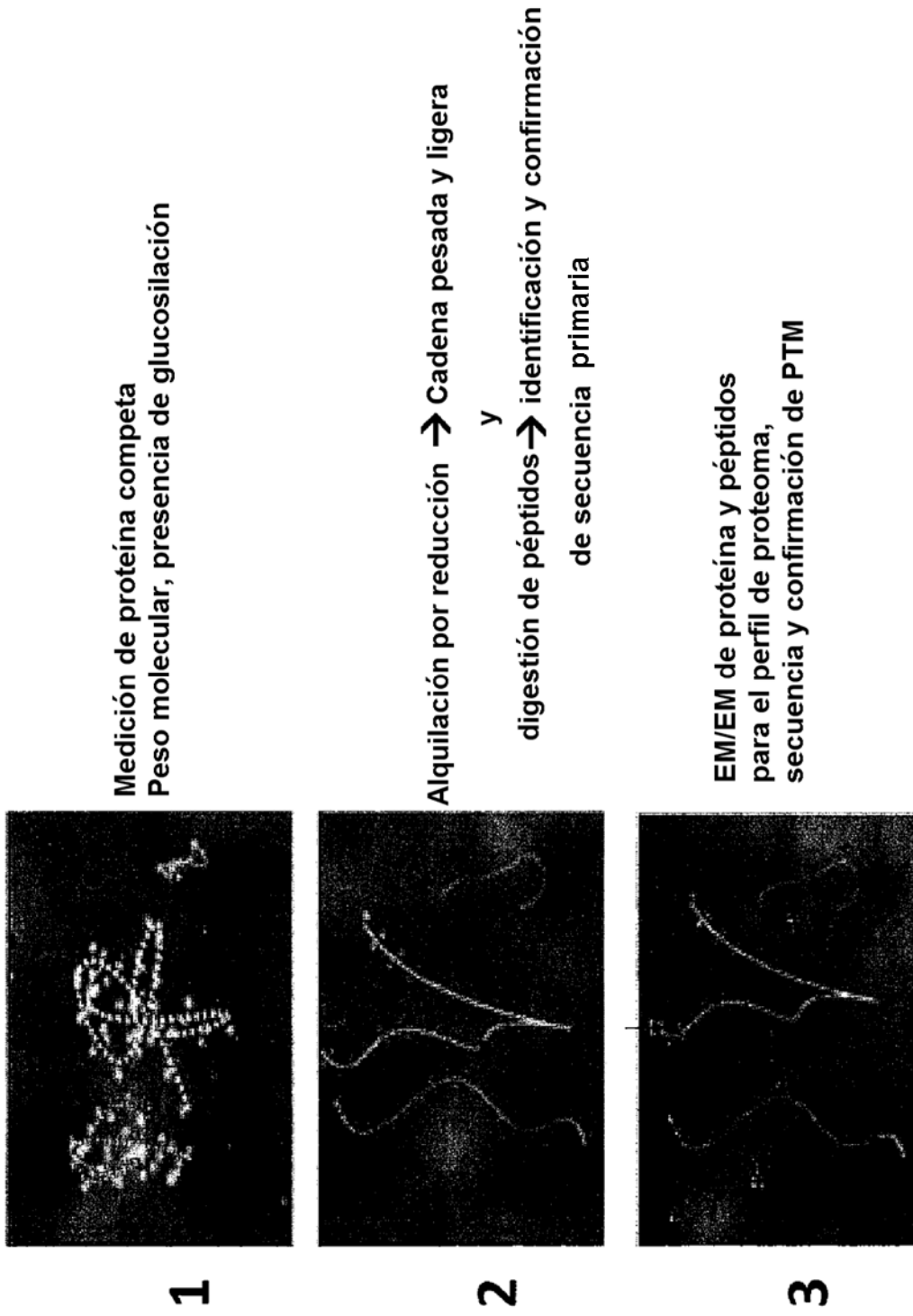
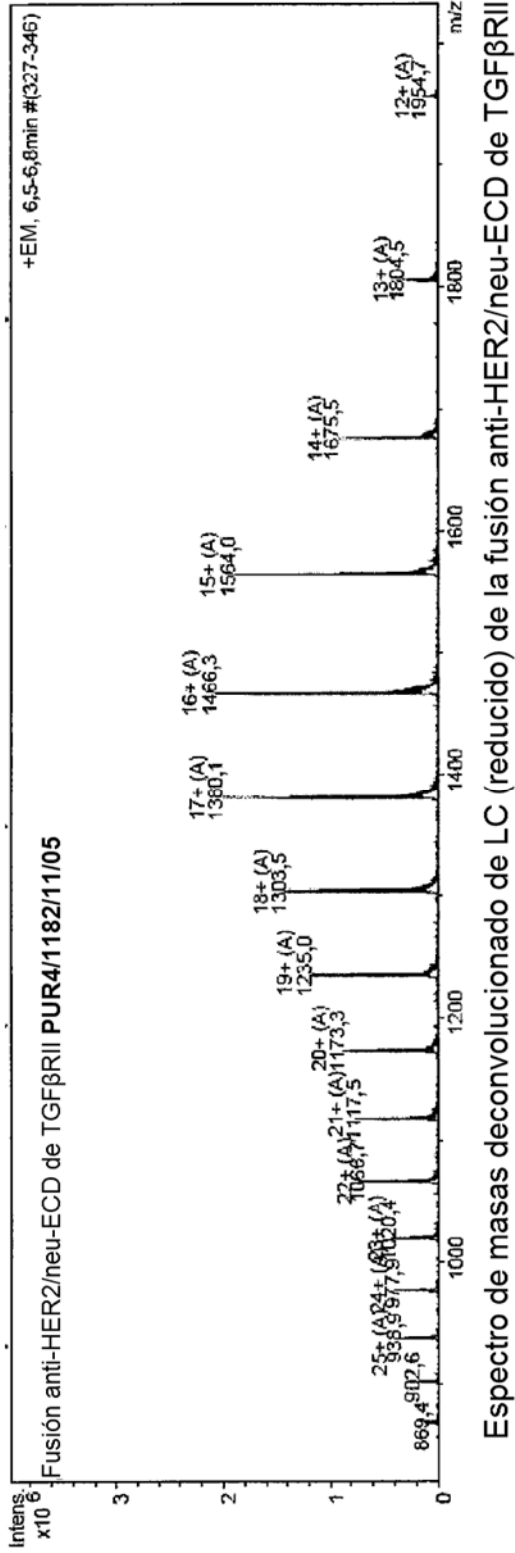


Figura 33

Espectro de masas de LC (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII



Espectro de masas deconvolucionado de LC (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII

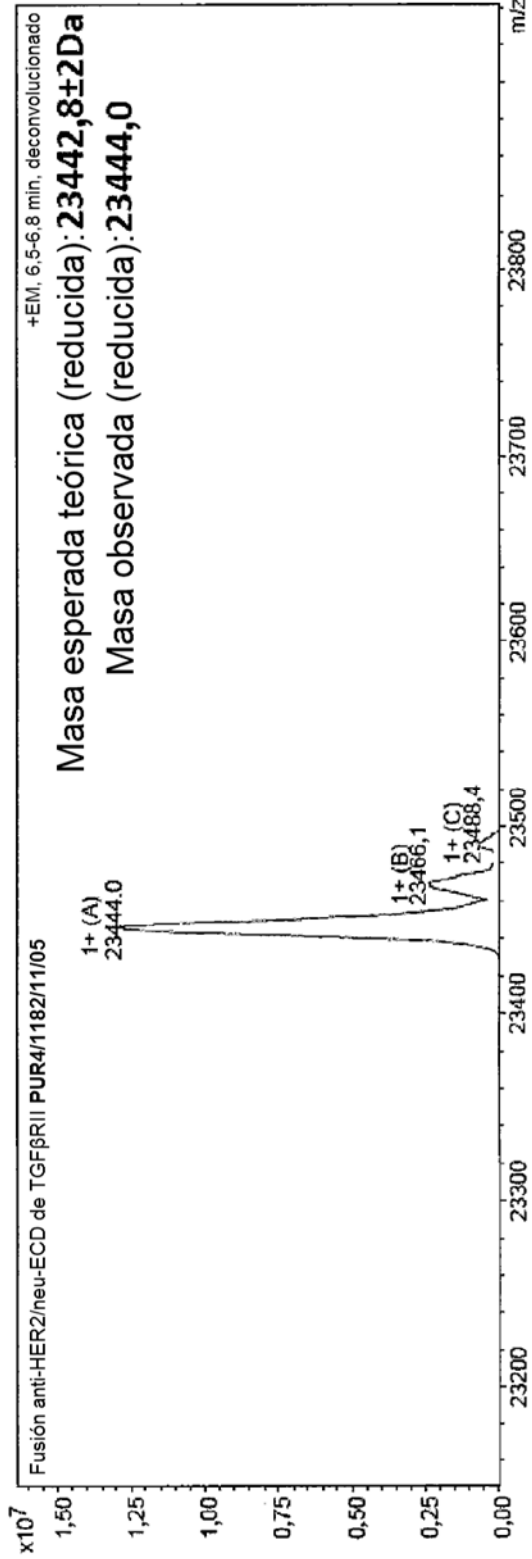


Figura 34

Espectro de masas de HC (reducido) de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII

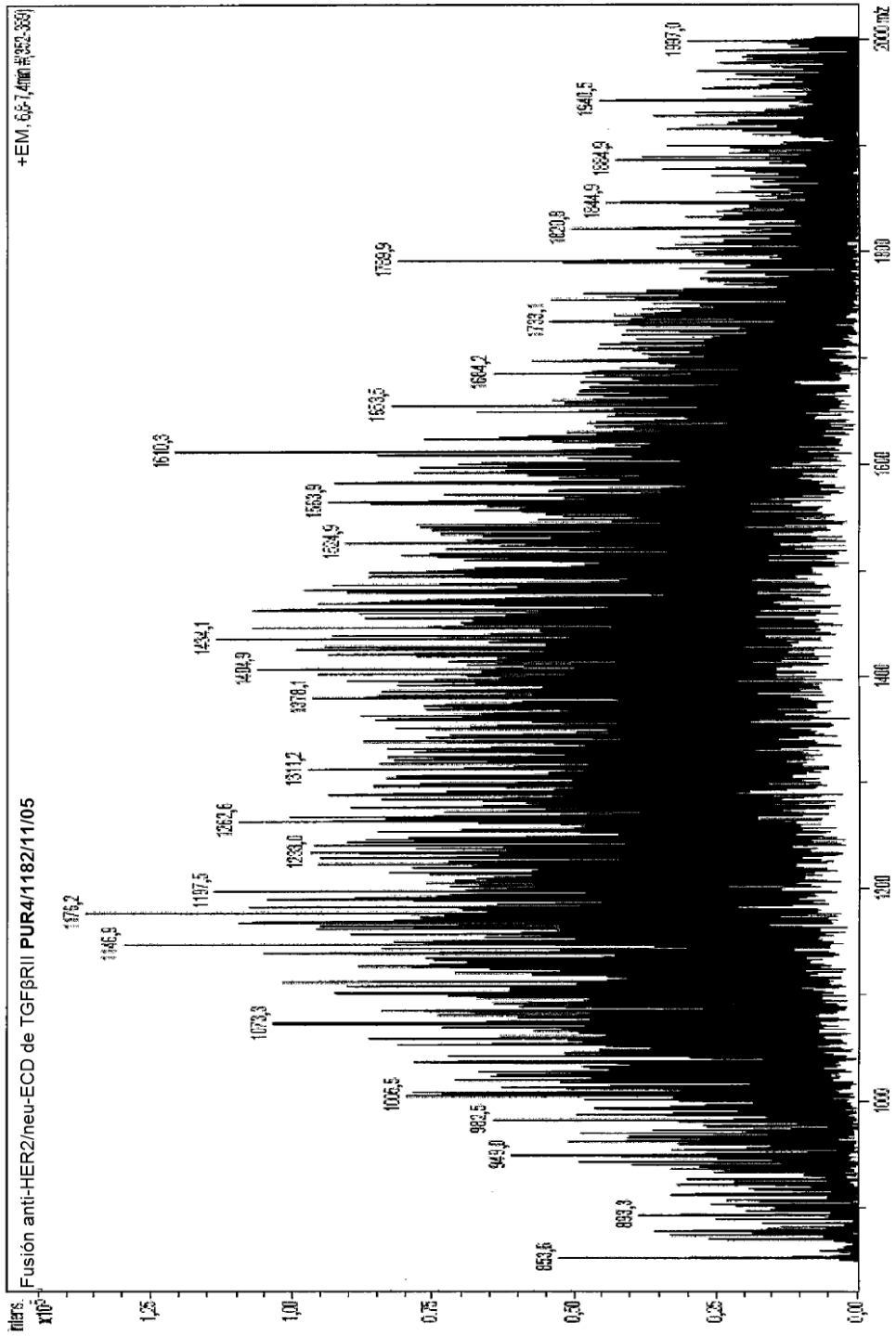


Figura 35

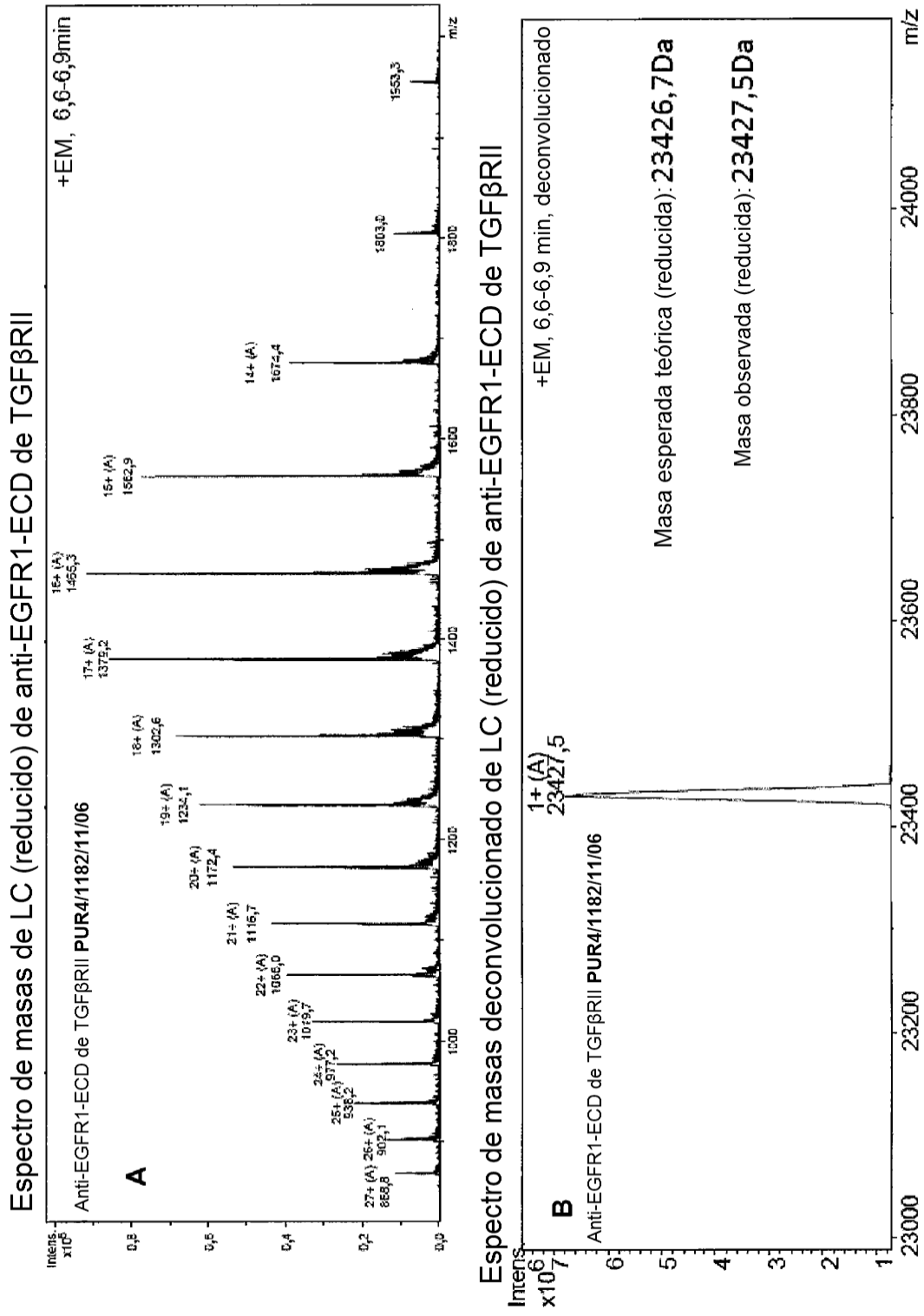


Figura 36

Espectro de masas de HC (reducido) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII

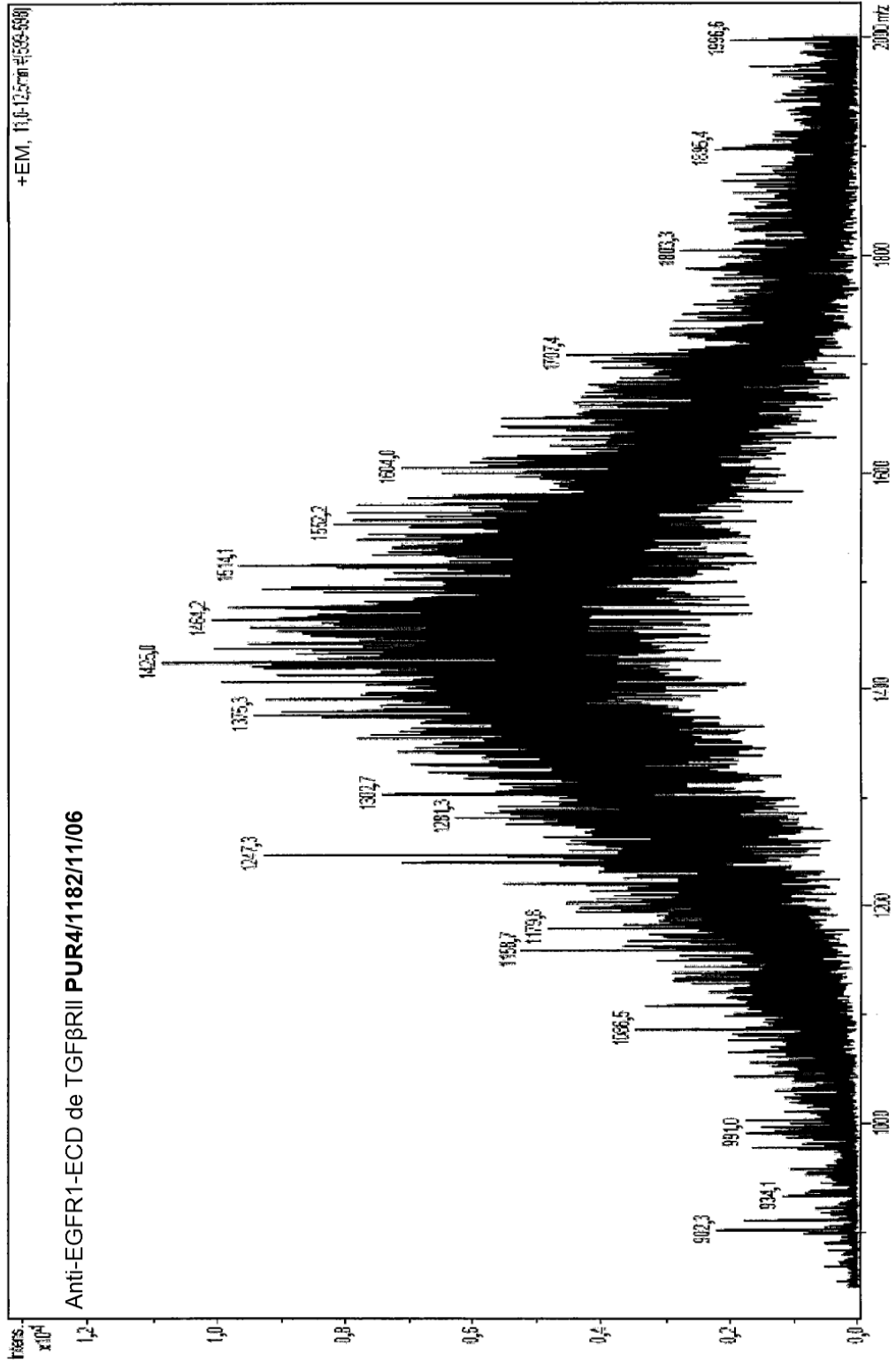


Figura 37

Cromatograma de UV de péptidos trípticos de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII

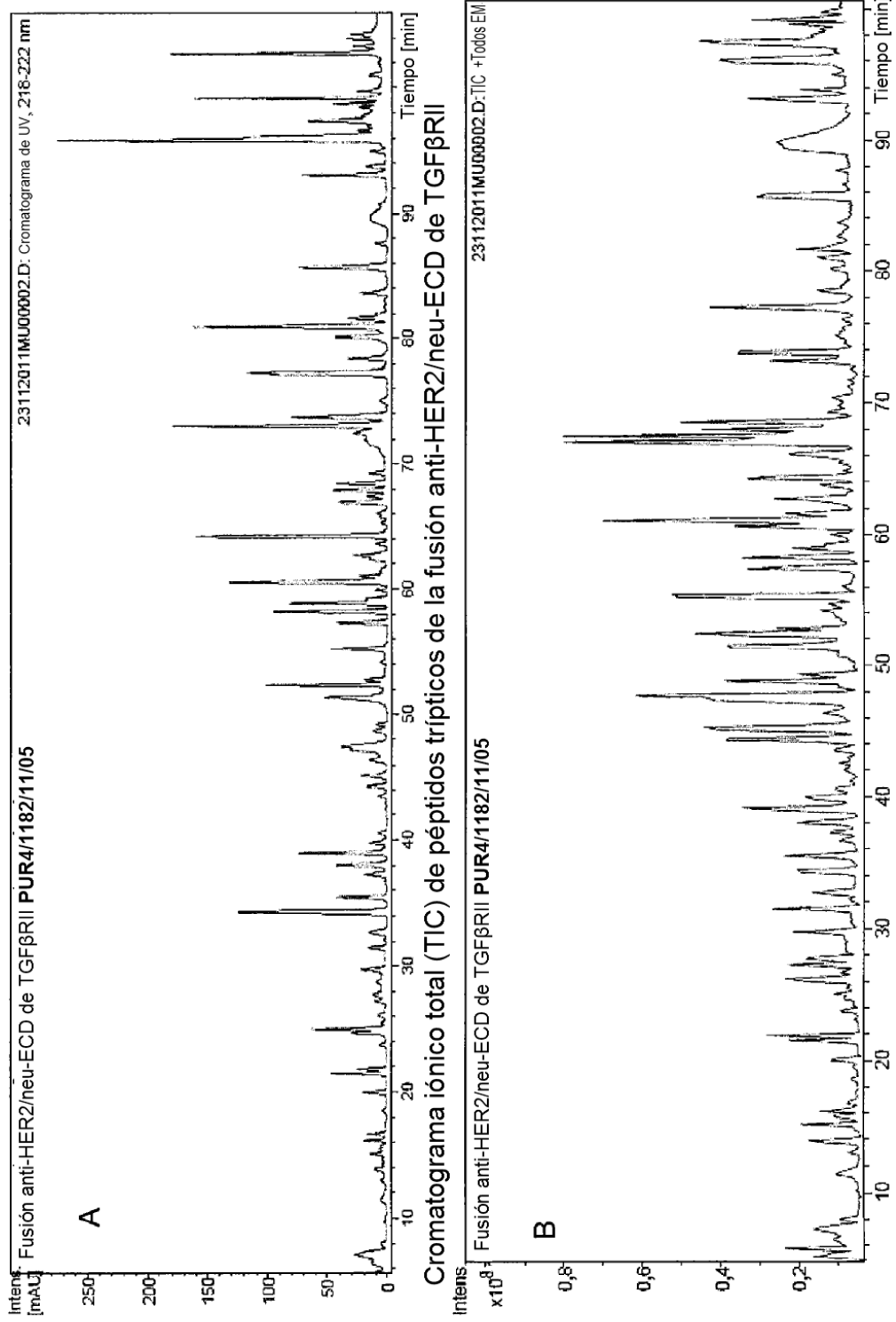


Figura 38

Lista de péptido tríptico esperado/observado de LC de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII

S.No	Intervalo	Secuencia	Masa esperada (M+H)+	Masa observada (M+H)+	TR (min)	EM/EM
1	LC(1-18)	DIQMTQSPSSLSASVGDR	1878,9	1879,2, 940,1+2	57,3	Si
2	LC(19-24)	VITTCR	749,3	749,4	31,7	Si
3	LC(25-42)	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	1990,9	1991,2, 996,1+2	58,1	Si
4	LC(43-45)	APK	314,9	315,3	5,9	Si
5	LC(46-61)	LLYSASFLYSGVPSR	1772,9	1773,1	93,1	Si
6	LC(62-66)	FSGSR	553,2	553,3	16,3	Si
7	LC(67-103)	SGTDFLTITSSIQPEDFATYYCQQHYI	4187,9	4188,1	95,7	NO
8	LC(104-107)	VEIK	488,3	488,3	26,2	Si
9	LC(108-108)	R	175,1	Fuera del intervalo de detección		
10	LC(109-126)	TVAAPSVFIFPPSDEQIK	1946,02	1946,1	89,1	Si
11	LC(127-142)	SGTASVWCLLNFPYR	1797,8	1797,9	97,4	Si
12	LC(143-145)	EAK	347,1	Fuera del intervalo de detección		
13	LC(146-149)	VQWK	560,3	560,4	34,3	Si
14	LC(150-169)	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	2135,9	2136,2	35,6	Si
15	LC(170-183)	DSTYSLSTLISK	1502,7	1502,9	67,8	Si
16	LC(184-188)	ADYEK	625,2	625,4	6,5	Si
17	LC(189-190)	HK	284,1	Fuera del intervalo de detección		
18	LC(191-207)	VYACEVTHQGLSPVTK	1875,9	1876,1	52,3	Si
19	LC(208-211)	SFNR	523,2	523,3	52,3	Si
20	LC(212-214)	GEC	365,1	Fuera del intervalo de detección		

Figura 39

Lista de péptido tríptico esperado/observado de HC de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII

S.No	Intervalo	Secuencia	Masa esperada (M+H)+	Masa observada (M+H)+	TR (min)	EM/EM
1	HC(1-19)	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	1881,9	1882,2, 941,6+2	68,5	S
2	HC(20-30)	LSCAASGFNIK	1167,5	1167,8, 584,4+2	55,2	S
3	HC(31-38)	DTYIHWVR	1089,5	1089,6, 545,3+2	64,2	S
4	HC(39-43)	QAPGK	500,2	500,3	7,4	S
5	HC(44-50)	GLEWVAR	830,4	830,5	60,6	S
6	HC(51-59)	IYPINGYTR	1084,5	1084,6, 542,8+2	38,1	S
7	HC(60-65)	YADSVK	682,3	682,4	21,6	S
8	HC(66-67)	GR	232,1	Fuera del intervalo de detección		S
9	HC(68-76)	FTISADTSK	969,4	969,5, 485,3+2	45,3	S
10	HC(77-87)	NTAYLQMNLSR	1310,6	1310,6, 655,8+2	61,4	S
11	HC(88-98)	AEDTAVYCSR	1334,6	1334,8, 667,9+2	38,9	S
12	HC(99-124)	WGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTK	2784,2	2784,3, 1393,2+2	95,7	S
13	HC(125-136)	GPSVFPLAPSSK	1186,6	1186,8, 593,9+2	67,1	S
14	HC(137-150)	STSGGTAALGCLVK	1321,6	1321,8, 661,4+2	61,1	S
15	HC(151-213)	DYFPEPVTYSWNSGALTS.....LGTQTYIC	6713,3	6, 1679,7-4,1343,8+5, 1120, 102,6		NO
16	HC(214-216)	VDK	361,2	Fuera del intervalo de detección		
17	HC(217-217)	K	147,1	Fuera del intervalo de detección		
18	HC(218-221)	VEPK	472,2	472,3	11,5	S
19	HC(222-225)	SCDK	509,1	509,4	5,2	S
20	HC(226-251)	THTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKK	2844,4	2844,6, 949,4+3	95,9	S
21	HC(252-258)	DTLMISR	835,4	835,5	48,7	S
22	HC(259-277)	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	2139,1	2139,2, 1070,1+2, 713,8+2	73,6	S
23	HC(278-291)	FNWYVDGVEVHNAK	1677,7	1677,8, 839,5+2	73,1	S
24	HC(292-295)	TKPR	501,3	501,3	7,2	S
25	HC(296-304)	EEQYNSTYR (GP)	1189,5+1444	2633,5, 1317,6+2	25,1	S
26	HC(305-320)	VVSVLTVLHQDWLNGK	1807,9	1808,1, 904,5+2	99,1	S
27	HC(321-323)	EYK	439,2	439,3	5,2	S
28	HC(324-325)	CK	307,1	Fuera del intervalo de detección		
29	HC(326-329)	VSNK	447,2	447,3	5,4	S
30	HC(330-337)	ALPAPIEK	838,4	838,5	47,5	S
31	HC(338-341)	TISK	448,2	448,3	13,9	S
32	HC(342-343)	AK	218,1	Fuera del intervalo de detección		
33	HC(344-347)	GQPR	457,2	457,3	6,9	S
34	HC(348-358)	EPQVYTLPPSR	1286,6	1286,7, 643,9+2	52,8	S
35	HC(359-363)	EEMTK	637,2	637,4	6,2	S
36	HC(364-373)	NQVSLTCLVK	1161,6	1161,7, 581,4+2	67,5	S
37	HC(374-395)	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2545,1	2545,1, 1273,1+2, 849,1+3	81,1	S
38	HC(396-412)	TTPPVLDSDGSFFLYSK	1873,9	1874,2, 937,6+2	85,8	S
39	HC(413-417)	LTVDK	575,3	575,4	27,4	S
40	HC(418-419)	SR	262,1	Fuera del intervalo de detección		
41	HC(420-442)	WQDGNVVFCSVMHEALFNHYTQK	2801,2	2801,4, 1401,2+2, 934,5+3	77,4	S
42	HC(443-450)	SLSLSPGK	788,4	788,5	44,3	S

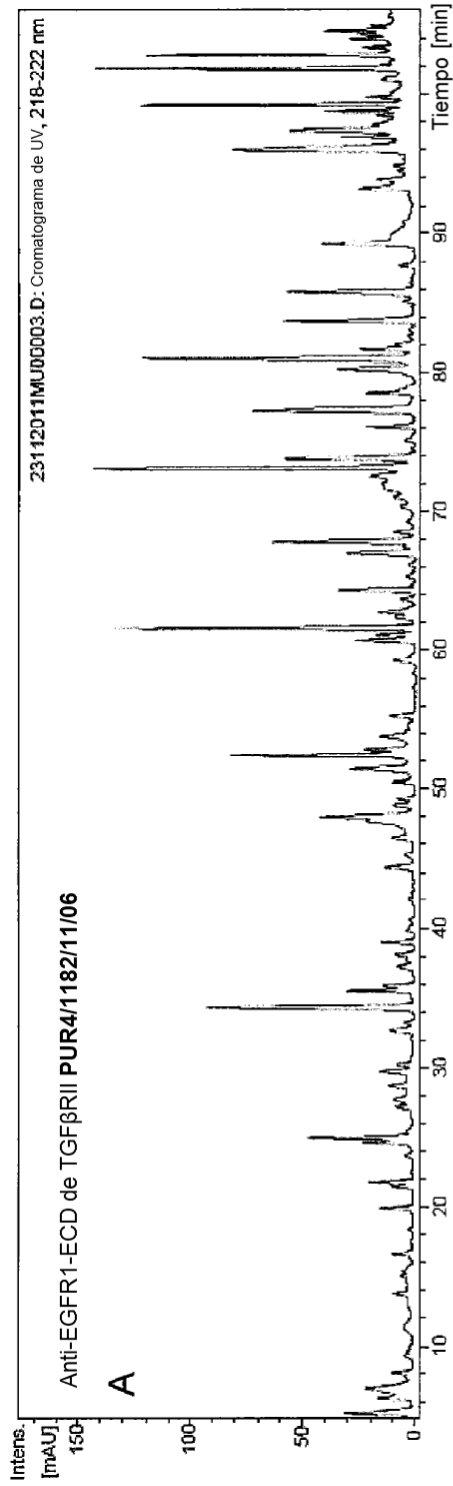
Figura 40

Lista de péptido tríptico esperado/observado de LM* de la fusión anti-HER2/neu-ECD de TGFβRII

S.No	Intervalo	Secuencia	Masa esperada (M+H)+	Masa observada (M+H)+	TR (min)	EM/EM
1	LM(1-23)	GGGGGGGGGGSTIPPHVQK	1864,8	1864,2, 932,6+2,	76,1	NO
2	LM(24-39)	SVNNDMIVTDNNGAVK	1690,7	1690,8, 846,1+2	49,3	SÍ
3	LM(40-45)	FPQLCK	792,4	792,5	51,3	SÍ
4	LM(46-50)	FCDVR	696,3	696,4	29,8	SÍ
5	LM(51-58)	FSTCDNQK	999,4	999,5	22,1	SÍ
6	LM(59-82)	SCMSNCSITSICEKQEVCAVWR	2901,2	No detectado		
7	LM(83-83)	K	147,1	Fuera del intervalo de detección		
8	LM(84-98)	NDENITLETVCHDPK	1784,8	1785,1	54,2	SÍ
9	LM(99-113)	LPYHDFLEDAASP	1715,8	1715,9	77,2	SÍ
10	LM(114-117)	CIMK	551,2	551,3	27,8	SÍ
11	LM(118-119)	EK	276,1	Fuera del intervalo de detección		
12	LM(120-120)	K	147,1	Fuera del intervalo de detección		
13	LM(121-152)	KPGETTFMCCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD	3794,8	No detectado		

Figura 41

Cromatograma de UV de péptidos trípticos de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII



Cromatograma iónico total (TIC) de péptidos trípticos de fusión anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.

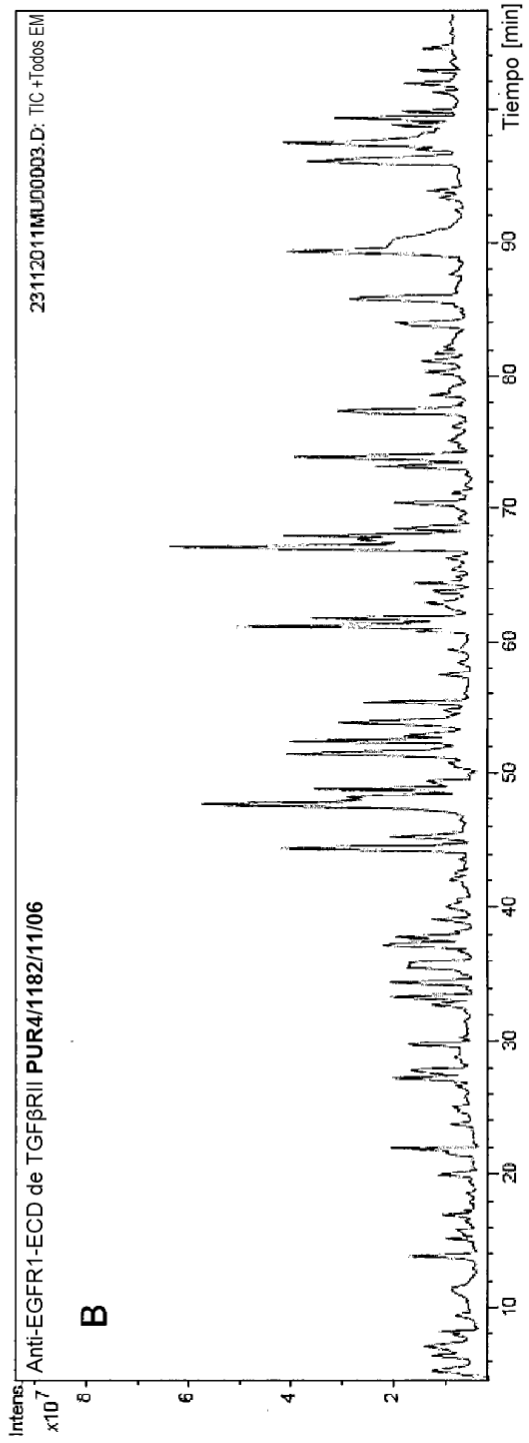


Figura 42

Lista de péptidos esperados/observados de la cadena ligera (LC) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.

S.No	Péptido	Secuencia	Masa esperada (M+H)+	Masa observada (M+H)+	TR (MIN)	EM/EM
1	LC(1-18)	DILLTQSPVILSVSPGER	1924	1924	89,2	SI
2	LC(19-24)	VSFSCR	755,3	755,4	35,9	SI
3	LC(25-39)	ASQSIGTNIHWYQQR	1788,8	1789	61,7	SI
4	LC(40-45)	TNGSPR	631,3	631,4	8,2	SI
5	LC(46-49)	LLIK	486,3	486,3	47,9	SI
6	LC(50-61)	YASESISGIPSR	1266,6	1266,6	48	SI
7	LC(62-103)	FSGSGGDTFLINSVESED	4565,9	4565,9	93,1	NO
8	LC(104-107)	LELK	502,3	502,4	37,8	SI
9	LC(108-108)	R	174,1	Fuera del intervalo de detección		
10	LC(109-126)	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	1946	1946,2	89,5	SI
11	LC(127-142)	SGTASVVCLLNNFYP	1797,8	1797,2	97,1	SI
12	LC(143-145)	EAK	347,1	Fuera del intervalo de detección		
13	LC(146-149)	VQWK	560,3	560,4	34,3	SI
14	LC(150-169)	VDNALQSGNSQESVTEQDS	2135,9	2136,2	35,6	SI
15	LC(170-183)	DSTYLSLSTLISK	1502,7	1502,9	67,8	SI
16	LC(184-188)	ADYEK	625,2	625,3	7	SI
17	LC(189-190)	HK	284,1	Fuera del intervalo de detección		
18	LC(191-207)	VYACEVTHQGLSSPVTK	1875,9	1876,2	52,5	SI
19	LC(208-211)	SFNR	523,2	523,3	20,1	SI
20	LC(212-214)	GEC	365,1	Fuera del intervalo de detección		

Figura 43

Lista de péptidos esperados/observados de la cadena pesada (HC) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.

S.No	Péptido	Secuencia	Masa esperada (M+H)+	Masa observada (M+H)+	TR (min)	EI/EM
1	HC(1-5)	QVQLK	615,3	598,4*	37,1	SI
2	HC(6-38)	QSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVH ¹	3564,9	3564,7	96,8	SI
3	HC(39-43)	QSPGK	516,2	516,3	6,4	SI
4	HC(44-66)	GLEWLGVIWVSGGNTDYNTRFTSR	2571,7	2571,4	101,8	SI
5	HC(67-71)	LSINK	574,3	574,5	33,2	SI
6	HC(72-75)	DNSK	463,2	No detectado	No detectado	
7	HC(76-96)	SOVFFMNSLQSNDAIYYCAR	2515,1	No detectado	No detectado	
8	HC(97-122)	ALTYDYEFAYWGGTLVTVSAASTK	2907,1	No detectado	No detectado	
9	HC(123-134)	GPSVFFLAPSSK	1186,6	1186,8	66,9	SI
10	HC(135-148)	STSGGTAALGCLVK	1321,6	1321,8	61,1	SI
11	HC(149-211)	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQS	6716,3	6715	102,6	NO
12	HC(212-214)	VDK	361,2	No detectado	No detectado	
13	HC(215-215)	R	175,1	Fuera del intervalo de detección	Fuera del intervalo de detección	
14	HC(216-219)	VEPK	472,2	472,3	11,2	SI
15	HC(220-223)	SCDK	509,1	No detectado	No detectado	
16	HC(224-249)	THTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK	2845,3	2845,6	95,8	SI
17	HC(250-256)	DTLMISR	835,4	835,5	48,9	SI
18	HC(257-275)	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	2139	2139,4	73,6	SI
19	HC(276-289)	FNWYVDGVEVHNAK	1677,7	1677,8	73,1	SI
20	HC(290-293)	TKPR	501,3	501,4	7,1	SI
21	HC(294-302)	EEQYNSTYR	1188,5	(+1444)Da 2634,2	25	SI
22	HC(303-318)	VVSIVLTVLHQDWLNGK	1809,1	1809,4	99	SI
23	HC(319-321)	EYK	439,2	439,3	5,4	SI
24	HC(322-323)	CK	307,1	Fuera del intervalo de detección	Fuera del intervalo de detección	
25	HC(324-327)	VSNK	447,2	447,3	5,4	SI
26	HC(328-335)	ALPAIEK	838,4	838,5	47,9	SI
27	HC(336-339)	TISK	448,2	448,3	14	SI
28	HC(340-341)	AK	218,1	Fuera del intervalo de detección	Fuera del intervalo de detección	
29	HC(342-345)	GQPR	457,2	457,3	6,9	SI
30	HC(346-356)	EPQVYLPPSR	1286,6	1286,7	52,8	SI
31	HC(357-361)	DELTK	605,3	605,4	11,3	SI
32	HC(362-371)	NQVSLTCLVK	1161,6	1161,7	67,4	SI
33	HC(372-393)	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2545,6	2545,4	80,8	SI
34	HC(394-410)	TTPPVLDSDGSFFLYSK	1873,9	1874	85,7	SI
35	HC(411-415)	LTVDK	575,3	575,4	27,2	SI
36	HC(416-417)	SR	262,1	Fuera del intervalo de detección	Fuera del intervalo de detección	
37	HC(418-440)	WQQQGNVFCFCSVMHEALHNNHYTQK	2801,2	2801,4	77,4	NO
38	HC(441-448)	SLSLSPGK	788,4	788,5	44,2	SI

Figura 44

Lista de péptidos esperados/observados del motivo unido (LM) de anti-EGFR1-ECD de TGFβRII.

S.No	Péptido	Secuencia	Masa esperada (M+H)+	Masa observada (M+H)+	TR (min)	EM/EM
1	LM(1-23)	GGGGGGGGGGSTIPPHVQX	1864,8	1864,2	76,3	NO
2	LM(24-39)	SVNNDMIVTDNNGAVK	1691,7	1691,8	49,2	SÍ
3	LM(40-45)	FPQLCK	792,4	792,5	51,5	SÍ
4	LM(46-50)	FCVVR	696,3	696,4	29,8	SÍ
5	LM(51-58)	FSTCDNQK	999,4	999,5	21,9	SÍ
6	LM(59-82)	SCMSNCSITSICEK	2903,3		No detectado	
7	LM(83-83)	K	147,1		Fuera del intervalo de detección	
8	LM(84-98)	NDENITLETVCHDPK	1784,8	1784,8	54,3	SÍ
9	LM(99-113)	LPYHDFILEDAAAPK	1715,8	1715,9	77,1	SÍ
10	LM(114-117)	CIMK	551,2	551,3	27,7	SÍ
11	LM(118-119)	EK	276,1		Fuera del intervalo de detección	
12	LM(120-120)	K	147,1		Fuera del intervalo de detección	
13	LM(121-152)	KPGETFFMCCSSDECDNIIFSEYNTSNPD	3796,9		No detectado	

Figura 45

Proteína de fusión cantuzumab-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de cantuzumab:

QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYTFYYGMNWKQAPGQGLKWMG
WIDTTTGEPTYAQKFQGRIFALESASTAYLQIKSLKSEDTATYFCARRGPYN
WYFDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de cantuzumab:

DIVMTQSPLSVPVTPGEPVSI SCRSSKLLHSNGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLIY
RMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCLQHLEYPFTFGPGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC
**GGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD**

Figura 46

Proteína de fusión cixutumumab-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de cixutumumab:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI
IPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE
WSTQDHYYYYYMDVWGKGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de cixutumumab:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENK
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSQHLVFGGGTKL
TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
AECSSGGGGSGGGGSGGGGS**TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF**
PQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPG
ETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 47

Proteína de fusión clivatuzumab-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de clivatuzumab:

**QVQLQQSGAEVKKFGASVKVSCEASGYTFPSYVLHWVKQAPGQGLEWIGYI
NPYNDGTQTNKKFKGKATLTRDTSINTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGFGGS
YGFAYNGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVNTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLNISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de clivatuzumab:

**DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGKAPKLWIYSTS
NLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSASYFCHQWNRYPYTFGGGTRLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYEAQVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSRKADEYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP
QLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGE
TFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD**

Figura 48

Proteína de fusión primumab-TGF β RII en la región constante LC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de primumab:

EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI
TPSGGSTNYADSVKGRFTISRDNQNTLYLQMNSLRVEDTAVYICGRVPYRST
WYPLYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de primumab:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS
LHSKVPTQFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYSTYPITFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDASPCKIMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 49

Proteína de fusión cantuzumab HC-4-1BB y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYFTYYGMNWVKQAPGQGLKWMG
WIDTTTGEPTYAQKFQGRIAFSLETSASTAYLQIKSLKSEDTATYFCARRGPYN
WYFDVWGGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSACP
WAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM
FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK
ELVAKAGVYYVFFQLELRRVAGEGSGSVSLALHLQPLRS
AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR
LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS
PRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de cantuzumab:

DIVMTQSPLSVPVTPGEPVSISCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIY
RMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCLQHLEYPFTFGPGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC
GGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 50

Proteína de fusión cixutumumab HC-4-1BB y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI
IPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE
WSTQDHYYYYYMDVWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAG
LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG
GLSYKEDTKELWAKAGVYVFFQLELRRVAGEGSGSVSL
ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL
LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVVLGLFRVT
PEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de cixutumumab:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENK
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSQHLVFGGGTKL
TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
AECSGGGGSGGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF
PQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPG
ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 51

Proteína de fusión clivatuzumab HC-4-1BB y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

QVQLQQSGAEVKKFGASVKVSCEASGYTFPSYVLHWVKQAPGQGLEWIGYI
NPYNDGTQTNKKFKGKATLTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGFGGS
YGFAYNGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVNTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLNISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGAC
PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQG
MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT
KELVAKAGVYVFFQLELRRVWAGEGSGSVSLALHLQPLR
SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR
LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS
PRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de clivatuzumab:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGKAPKLWIYSTS
NLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSASYFCHQWNRYPTYFGGGTRLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYEAQVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSPRKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP
QLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGE
TFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 52

Proteína de fusión primumab HC-4-1BB y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-4-1BB:

EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI
TPSGGSTNYADSVKGRFTISRDNLSQNTLYLQMNSLRVEDTAVYICGRVPYRST
WYPLYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSACP
WAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM
FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK
ELVAKAGVYVFFQLELRVAGEGSGSVSLALHLQPLRS
AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR
LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS
PRSE

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de primumab:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS
LHVKVPTQFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYSTYPITFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GGGGSGGGGSGGGGS**TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL**
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 53

Proteína de fusión cantuzumab HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYFTYYGMNWKQAPGQGLKWMG
WIDTTTGEPTYAQKFQGRIFALESASTAYLQIKSLKSEDTATYFCARRGPYN
WYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSPGWF
LDSPDRPWNPPFTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWYRM
SPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRA
RRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de cantuzumab:

DIVMTQSPLSVPVTPGEPVSISCRSSKLLHSNGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLIY
RMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCLQHLEYPFTFGPGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC
GGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETF
FMCS CSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 54

Proteína de fusión cixutumumab HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI
IPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAPLRFLE
WSTQDHYYYYYMDVWGKGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT
SESFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNG
RDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERR
AEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de cixutumumab:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENK
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGGSGQHLVFGGGTKL
TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
AECSGGGGSGGGGSGGGGSGTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF
PQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPG
ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 55

Proteína de fusión clivatuzumab HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

QVQLQQSGAEVKKFGASVKVSCEASGYTFPSYVLHWVKQAPGQGLEWIGYI
NPYNDGTQTNKKFKGKATLTRDTSINTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGFGGS
YGFAYNGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVNTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLNISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSPG
WFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWY
RMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVV
RARNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP
PSPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de clivatuzumab:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGKAPKLWIYSTS
NLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSASYFCHQWNRYPTYFGGGTRLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYEAQVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSPRKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**STIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP**
QLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKK**PGE**
TFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 56

Proteína de fusión primumab HC-PD1 y LC-TGFβRII

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-PD1:

EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI
TPSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSTLYLQMNSLRVEDTAVYICGRVPYRST
WYPLYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSPGWF
LDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWYRM
SPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVRA
RRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la cadena ligera de primumab:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS
LHSKVPTQFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYSTYPITFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Figura 57

Proteína de fusión cantuzumab HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYTFYYGMNWWKQAPGQGLKWMG
WIDTTTGEPTYAQKFQGRIFAFLSASTAYLQIKSLKSEDTATYFCARRGPYN
WYFDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**TIPP**
HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKS
CMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPY
HDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDepkscdkACPWAVSGARASPGSAASPRLREGP
ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDP
GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRRVA
GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN
SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA
TVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIVMTQSPLSVPVTPGEPVSISCRSSKLLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIY
RMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCLQHLEYPFTFGPGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

Figura 58

Proteína de fusión cixutumumab HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI
IPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE
WSTQDHYYYYYMDVWVGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVR
FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLET
VCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSS
DECNDNIIFSEEYNTSNP*Depkscdk***ACPWAVSGARASPGSA**
ASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID
GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELWAKAGVYVFF
QLELRRVWAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL
PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH
AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENK
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYCKSRDGSQHLVFGGGTKL
TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
AECS

Figura 59

Proteína de fusión clivatuzumab HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

QVQLQQSGAEVKKFGASVKVSCEASGYTFPSYVLHWVKQAPGQGLEWIGYI
NPYNDGTQTNKKFKGKATLTRDTSINTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGFGGS
YGFAYNGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVNTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDNLNISRTPVEVC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIP
PHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQK
SCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLP
YHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDepkscdkACPWAVSGARASPGSAASPRLREG
PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD
PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVW
AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR
NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG
ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGKAPKLWIYSTS
NLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSASYFCHQWNRYPYTFGGGTRLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYEAQVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSPRKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

Figura 60

Proteína de fusión primumab HC-TGFβRII-4-1BB

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-4-1BB:

EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI
TPSGGSTNYADSVKGRFTISRDNQNTLYLQMNSLRVEDTAVYICGRVPYRST
WYPLYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGSTIPP
HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKS
CMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPY
HDFILEDASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNP*Depkscdk***ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGP**
ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP
GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRRVA
GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN
SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA
TVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS
LHVKVPTQFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYSTYPITFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 61

Proteína de fusión cantuzumab HC-TGFβRII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-PD1:

QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYTFYYGMNWWKQAPGQGLKWMG
WIDTTTGEPTYAQKFQGRIFAFLSASTAYLQIKSLKSEDTATYFCARRGPYN
WYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGGSTIPP
HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKS
CMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPY
HDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDepkscdk*PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGD*
NATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDC
RFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESL
RAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIVMTQSPLSVPVTPGEPVSISCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLIY
RMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCLQHLEYPFTFGPGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

Figura 62

Proteína de fusión cixutumumab HC-TGFβRII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-PD1:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGI
IPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAPLRFLE
WSTQDHYYYYYMDVWVGKTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGG**STIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVR**
FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVWRKNDENITLET
VCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSS
DECNDNIIFSEEYNTSNP*DepkscdkPGWFLDSPDRPWNPPPTFS*
PALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPPE
DRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISL
APKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENK
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSQHLVFGGGTKL
TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
AECS

Figura 63

Proteína de fusión clivatuzumab HC-TGF β RII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGF β RII-PD1:

QVQLQQSGAEVKKFGASVKVSCEASGYTFPSYVLHWVKQAPGQGLEWIGYI
NPYNDGTQTNKKFKGKATLTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGFGGS
YGFAYNGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVNTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDNLNISRTPVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGSGGGGSTIP
PHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQK
SCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLP
YHDFILEDASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNP*Depkscdk**PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVWTEGD*
NATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDC
RFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESL
RAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGKAPKLWIYSTS
NLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSASYFCHQWNRYPYTFGGGTRLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYEAQVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSLRKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

Figura 64

Proteína de fusión primumab HC-TGFβRII-PD1

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión cadena pesada-TGFβRII-PD1:

EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI
TPSGGSTNYADSVKGRFTISRDNQNTLYLQMNSLRVEDTAVYICGRVPYRST
WYPLYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGG**STIPP**
HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKS
CMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPY
HDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNP*Depkscdk**PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVWTEGD*
NATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDC
RFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESL
RAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLV

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASS
LHSKVPTQFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYSTYPITFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 65