

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 046**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014 PCT/EP2014/002181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014 E 14761280 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3030575**

54 Título: **Modulocinas basadas en el dominio sushi de IL-15 e IL-15r-alfa**

30 Prioridad:

08.08.2013 EP 13003963

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2018

73 Titular/es:

CYTUNE PHARMA (25.0%)

3 chemin Pressoir Chênaie

44100 Nantes, FR;

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%);

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS

(25.0%) y

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA

RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)

72 Inventor/es:

GEY, ALAIN;

TARTOUR, ERIC y

BECHARD, DAVID

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 690 046 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

Modulocinas basadas en el dominio sushi de IL-15 e IL-15r-alfa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas “inmunocitocinas”, denominadas en el presente documento modulocinas, tal como se define en las reivindicaciones.

10 Antecedentes

El sistema inmunitario de los vertebrados requiere múltiples interacciones moleculares y celulares para lograr respuestas inmunitarias óptimas frente a un tumor.

15 Actualmente, la inmunidad antitumoral del huésped se ve afectada principalmente por TIL (GALON *et al.*, Science, vol. 313, págs. 1960-1964, 2006). De hecho, múltiples líneas de evidencia han indicado que los TIL se someten a regulación inhibitoria por las células tumorales.

20 Con el fin de “reactivar” dichos TIL, se han previsto múltiples estrategias y dianas. Estas estrategias se basan o bien en la i) inhibición de receptores inmunosupresores de TIL (por ejemplo CTLA-A4, PD-1, BTLA, LAG3 HAVCR2, ADORA2A o KIR inhibidores) para promover la activación inmunitaria impidiendo señales de regulación por disminución; o bien en la ii) estimulación de receptores coestimuladores de TIL (por ejemplo CD40, 4-1BB, OX-40 o proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR)), para promover la activación de células T y/o NK.

25 Incluso si dichas terapias ya han proporcionado algunos resultados prometedores, parece que la eficacia de estas estrategias está limitada. La mayor parte del tiempo, sólo un pequeño porcentaje de las cohortes muestra una respuesta de TIL restablecida.

30 Con el fin de obtener eficacia reforzada, ahora se prevé combinar estas estrategias con otros fármacos o modulador. Por tanto, los inventores intentan combinar estas estrategias con un anticuerpo anti-PD-1 con el modulador dado a conocer en la solicitud de patente WO 2007/046006.

35 Los resultados han mostrado que esta combinación no pudo restablecer una porción significativa, es decir, aproximadamente el 20%, de los TIL aislados de pacientes con carcinoma de células renales.

40 El documento WO 2012/175222 da a conocer una inmunocitocina que comprende (a) un conjugado, y (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo unido directa o indirectamente mediante covalencia a dicho conjugado, en el que dicho conjugado comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la interleucina 15 o derivados de la misma, y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de la IL-15R α o derivados de la misma. STEEL *et al.* (Trends in Pharmacological Sciences, vol. 33, n.º 1, páginas 35-41, 2011) da a conocer la biología de interleucina-15 y sus implicaciones terapéuticas en cáncer. CARSON *et al.* (Clinical Cancer research, vol. 16, n.º 24, páginas 5917-5919, 2010) da a conocer que el bloqueo de las rutas inhibitorias CTLA-4 y PD-1 en células T mediante la administración de anticuerpos neutralizantes durante la terapia con IL-15 potencia la supervivencia de ratones que portan tumores.

Sumario de la invención

50 Ahora, los inventores también intentaron otra combinación en la que el mismo modulador se fusionaba con el mismo anticuerpo proporcionando un tipo nuevo de inmunocitocinas que denominaron “modulocinas”. De manera sorprendente, y en comparación con la combinación previa, esta combinación ha proporcionado fuertes reactivaciones de TIL, reactivación que se observó para la mayoría de los TIL, es decir, aproximadamente el 80%.

55 Esta fuerte sinergia permite prever nuevas terapias.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una inmunocitocina que comprende:

- 60 1. A) un conjugado, y
- 2. B) un anticuerpo inmunomodulador, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, unido directa o indirectamente mediante covalencia a dicho conjugado,
- 65 en el que dicho anticuerpo inmunomodulador o fragmento del mismo

1. a. inhibe un receptor inmunosupresor y se selecciona del grupo que comprende antagonistas de CTLA-4, antagonistas de KIR inhibidores, antagonistas de BTLA, antagonistas de LAG3, antagonistas de HAVCR2, antagonistas de ADORA2A y antagonistas de PD-1, o

- 5 2. b. estimula un receptor coestimulador y se selecciona del grupo que comprende agonistas de CD40, agonistas de CD137, agonistas de CD134 y agonistas de TNFRSF18,

en el que dicho conjugado comprende:

- 10 1. (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina-15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de interleucina-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y

- 15 2. (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a interleucina-15 humana.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para una inmunocitocina tal como se describió anteriormente.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente.

25 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped modificada por ingeniería genética con el polinucleótido o con el vector descrito anteriormente. También se proporciona en el presente documento un método de producir una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa una inmunocitocina según la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico o un vector tal como se describió anteriormente en una célula huésped, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped modificada por ingeniería genética recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicha inmunocitocina.

30 En una realización preferida, dicha célula huésped modificada por ingeniería genética es una célula animal, y preferiblemente una célula CHO.

35 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la inmunocitocina tal como se describió anteriormente, un ácido nucleico que codifica para la misma, o un vector de ácido nucleico que comprende dicho ácido nucleico, asociada finalmente con un portador farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización preferida, dicha composición comprende un agente terapéutico adicional, que es preferiblemente un agente anticancerígeno.

45 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente para tratar cáncer en un sujeto.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a los productos que contienen:

- 50 1. (i) una inmunocitocina tal como se describió anteriormente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma, o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo, y

2. (ii) un agente terapéutico, preferiblemente un agente anticancerígeno,

como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para tratar cáncer en un sujeto.

55 También se proporciona en el contexto de la presente invención la composición farmacéutica tal como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

60 También se proporciona en el presente documento una inmunocitocina tal como se describió anteriormente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma, o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende la etapa de administrar de manera simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- 65 1. (i) una inmunocitocina tal como se describió anteriormente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma, o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo, y

2. (ii) un agente terapéutico, preferiblemente un agente anticancerígeno.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la expresión de PD-1, Tim-3 e IL-15R α en TIL del paciente A (A) y en el paciente B (B).

La figura 2 muestra la reactivación de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) inducidos por el anticuerpo anti-PDI (HBAT), mediante RLI, mediante una combinación de RLI y HBAT (RLI + HBAT) o mediante la modulocina de la invención (HBAT - RLI).

Descripción detallada

El término “inmuncitocina” se refiere a una molécula que comprende un anticuerpo o fragmentos del mismo unido directa o indirectamente mediante covalencia a una citocina o derivados de la misma. Dicho anticuerpo y dicha citocina pueden unirse mediante un péptido ligador.

Conjugado de la inmuncitocina de la invención

El término “interleucina 15” en su significado general en la técnica y se refiere a una citocina con similitud estructural con IL-2 (GRABSTEIN *et al.*, Science, vol. 264 (5161), págs. 965-968, 1994). Esta citocina también se conoce como IL-15, IL15 o MGC9721. Esta citocina e IL-2 comparten muchas actividades biológicas y se encontró que se unían a subunidades de receptor de hematopoyetina comunes. Por tanto, pueden competir por el mismo receptor, regulando de manera negativa la actividad del otro. Se ha establecido que IL-15 regula la activación y proliferación de células T y citolíticas naturales, y se muestra que el número de células de memoria CD8+ está controlado por un equilibrio entre esta citocina e IL2. La actividad de IL-15 puede medirse determinando su inducción de proliferación sobre la línea celular kit225 (HORI *et al.*, Blood, vol. 70 (4), págs. 1069-72, 1987), tal como se da a conocer en los ejemplos.

Dicha IL-15 o derivados de la misma tienen al menos el 10% de la actividad de interleucina-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, preferiblemente al menos el 25% y más preferiblemente al menos el 50%.

Dicha interleucina 15 es una interleucina 15 de mamífero, preferiblemente una interleucina 15 de primate, y más preferiblemente una interleucina 15 humana.

La interleucina 15 de mamífero puede identificarse de manera sencilla por el experto. Como ejemplo, puede citarse la interleucina 15 de *Sus scrofa* (número de registro ABF82250), de *Rattus norvegicus* (número de registro NP_037261), de *Mus musculus* (número de registro NP_032383), de *Bos taurus* (número de registro NP_776515), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro NP_001075685), de *Ovis aries* (número de registro NP_001009734), de *Felis catus* (número de registro NP_001009207), de *Macaca fascicularis* (número de registro BAA19149), de *Homo sapiens* (número de registro NP_000576), de *Macaca mulatta* (número de registro NP_001038196), de *Cavia porcellus* (número de registro NP_001166300) o de *Clorocebus sabaeus* (número de registro ACI289).

Tal como se usa en el presente documento, el término “interleucina 15 de mamífero” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n°: 1.

La interleucina 15 de primate puede identificarse de manera sencilla por el experto. Como ejemplo, puede citarse la interleucina 15 de *Sus scrofa* (número de registro ABF82250), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro NP_001075685), de *Macaca fascicularis* (número de registro BAA19149), de *Homo sapiens* (número de registro NP_000576), de *Macaca mulatta* (número de registro NP_001038196) o de *Clorocebus sabaeus* (número de registro ACI289).

Tal como se usa en el presente documento, el término “interleucina 15 de primate” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n°: 2.

La interleucina 15 humana puede identificarse de manera sencilla por el experto y se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID n°: 3.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados de interleucina 15” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 10 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID n°: 1, SEQ ID n°: 2 y SEQ ID n°: 3, preferiblemente de al menos el 96% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos) o de al menos el 99% es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados pueden identificarse de manera sencilla por el experto en vista de su conocimiento personal y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. Como ejemplo de tales derivados, pueden citarse los descritos en la solicitud de patente internacional PCT WO 2009/135031. También se entenderá que pueden reemplazarse aminoácidos naturales por aminoácidos

químicamente modificados. Normalmente, tales aminoácidos químicamente modificados aumentan la semivida del polipéptido.

5 Tal como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias que van a compararse, obtenidos con la mejor alineación de dichas secuencias, siendo este porcentaje meramente estadístico y extendiéndose las diferentes entre estas dos secuencias de manera aleatoria sobre las secuencias de aminoácidos. Tal como se usa en el presente documento, "mejor alineación" o "alineación óptima", significa la alineación para la que el porcentaje de identidad determinado (véase a continuación) es el más alto. Habitualmente se realiza comparación de secuencias
10 entre dos secuencias de aminoácidos mediante comparación de estas secuencias que se han alineado anteriormente según la mejor alineación; esta comparación se realiza en segmentos de comparación con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. Puede llevarse a cabo la mejor alineación de secuencias para realizar comparación, además de mediante una manera manual, usando el algoritmo de homología local desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol. 2, págs. 482, 1981), usando el algoritmo de homología global desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, págs. 443, 1970), usando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, págs. 2444, 1988), usando programas informáticos que usan tales algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI EE.UU.), usando los algoritmos de alineación múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, págs. 1792, 2004), o usando CLUSTAL (GOUJON *et al.*, Nucleic Acids Research, vol. 38, W695-9, 2010). Para obtener la mejor alineación local, puede usarse preferiblemente el software BLAST con la matriz BLOSUM 62. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima, pudiendo abarcar las secuencias de aminoácidos adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia con el fin de obtener la alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de
25 identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número entre el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

30 Preferiblemente, los derivados de interleucina 15 son agonista o superagonista de IL-15. Un experto en la técnica puede identificar de manera sencilla un agonista o superagonista de IL-15. Como ejemplo de agonista o superagonista de IL-15, puede citarse los datos a conocer en la solicitud de patente internacional WO 2005/085282 o en ZHU *et al.* (J. Immunol., vol. 183 (6), págs. 3598-607, 2009).

35 Todavía preferiblemente, dicho agonista o superagonista de IL-15 se selecciona del grupo que comprende/que consiste en L45D, L45E, S51D, L52D, N72D, N72E, N72A, N72S, N72Y y N72P (en referencia a la secuencia de IL-15 humana, SEQ ID n°: 3).

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "el dominio sushi de IL-15R α " tiene su significado general en la técnica y se refiere a un dominio que empieza en el primer residuo de cisteína (C1) después del péptido de señal de IL-15R α , y que termina en el cuarto residuo de cisteína (C4) después de dicho péptido de señal. Dicho dominio sushi correspondiente a una porción de la región extracelular de IL-15R α es necesario para su unión a IL-15 (WEI *et al.*, J. Immunol., vol. 167 (1), págs. 277-282, 2001).

45 Dicho dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma tiene al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a interleucina-15 humana, preferiblemente al menos el 25% y más preferiblemente al menos el 50%. Dicha actividad de unión puede determinarse de manera sencilla mediante el método dado a conocer en WEI *et al.* (mencionado anteriormente, 2001).

50 Dicho dominio sushi de la IL-15R α es el dominio sushi de una IL-15R α de mamífero, preferiblemente el dominio sushi de una IL-15R α de primate y más preferiblemente el dominio sushi de la IL-15R α humana.

55 El dominio sushi de una IL-15R α de mamífero puede identificarse de manera sencilla por el experto. Como ejemplo, puede citarse el dominio sushi de una IL-15R α de *Rattus norvegicus* (número de registro XP_002728555), de *Mus musculus* (número de registro EDL08026), de *Bos taurus* (número de registro XP_002692113), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro XP_002723298), de *Macaca fascicularis* (número de registro ACI42785), de *Macaca nemestrina* (número de registro ACI42783), de *Homo sapiens* (número de registro Q13261.1), de *Macaca mulatta* (número de registro NP_001166315), *Pongo abelii* (número de registro XP_002820541), *Cercocebus torquatus* (número de registro ACI42784), *Callithrix jacchus* (número de registro XP_002750073), o de *Cavia porcellus* (número de registro NP_001166314).
60

Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio sushi de una IL-15R α de mamífero" se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n°: 4.

65 Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de una IL-15R α de mamífero se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n°: 5.

El dominio sushi de una IL-15R α de primate puede identificarse de manera sencilla por el experto. Como ejemplo, pueden citarse los dominios sushi de IL-15R α de *Oryctolagus cuniculus*, de *Macaca fascicularis*, de *Macaca nemestrina*, de *Homo sapiens*, de *Macaca mulatta*, *Pongo abelii*, *Cercocebus torquatus* o *Callithrix jacchus*.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio sushi de una IL-15R α de primate” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n $^{\circ}$: 6.

10 Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de una IL-15R α de primate se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n $^{\circ}$: 7.

El dominio sushi de IL-15R α humana puede identificarse de manera sencilla por el experto y se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID n $^{\circ}$: 8.

15 Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α humana se refiere a SEQ ID n $^{\circ}$: 9.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados del dominio sushi de la IL-15R α ” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID n $^{\circ}$: 4, SEQ ID n $^{\circ}$: 5, SEQ ID n $^{\circ}$: 6, SEQ ID n $^{\circ}$: 7, SEQ ID n $^{\circ}$: 8, y SEQ ID n $^{\circ}$: 9, preferiblemente de al menos el 96% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido).
25 Tales derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de L-15R α y pueden identificarse de manera sencilla por el experto en vista de su conocimiento general y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. También se entenderá que pueden reemplazarse aminoácidos naturales por aminoácidos químicamente modificados. Normalmente, tales aminoácidos químicamente modificados permiten aumentar la semivida del polipéptido.

30 Según una realización preferida, el conjugado comprende (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de IL-15R α o derivados de la misma.

35 El dominio bisagra de IL-15R α se define como la secuencia de aminoácidos que empieza en el primer residuo amino después del dominio sushi y que termina en el último residuo de aminoácido antes del primer posible sitio de glicosilación. En IL-15R α humana, la secuencia de aminoácidos de la región bisagra consiste en los catorce aminoácidos que se sitúan después del dominio sushi de esta IL-15R α , en una posición C-terminal en relación con dicho dominio sushi, es decir, dicha región bisagra de IL-15R α comienza en el primer aminoácido después de dicho (C4) residuo de cisteína, y termina en el decimocuarto aminoácido (contando en la orientación “desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal” convencional).

40 Dichos dominios sushi y bisagra de IL-15R α son los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de mamífero, preferiblemente los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de primate y más preferiblemente los dominios sushi y bisagra de la IL-15R α humana.

45 La secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de mamífero puede identificarse de manera sencilla por el experto. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de mamífero” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n $^{\circ}$: 10.

50 La secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de primate puede identificarse de manera sencilla por el experto. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de primate” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n $^{\circ}$: 11.

55 La secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de IL-15R α humana puede identificarse de manera sencilla por el experto. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de IL-15R α humana” se refiere a la secuencia de consenso SEQ ID n $^{\circ}$: 12.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados de los dominios sushi y bisagra de IL-15R α ” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 93% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID n $^{\circ}$: 10, SEQ ID n $^{\circ}$: 11 y SEQ ID n $^{\circ}$: 12, preferiblemente de al menos el 97% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de L-15R α y puede identificarse de manera sencilla por el experto en vista de su conocimiento general y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. También

se entenderá que pueden reemplazarse aminoácidos naturales por aminoácidos químicamente modificados. Normalmente, tales aminoácidos químicamente modificados permiten aumentar la semivida del polipéptido.

5 Ambos polipéptidos i) y ii) del conjugado pueden unirse de manera no covalente tal como en el complejo dado a conocer en la patente US 8.124.084 B2. Dicho conjugado o complejo puede obtenerse de manera sencilla proporcionando una cantidad adecuada del polipéptido i), proporcionando una cantidad adecuada del polipéptido ii), mezclando ambos polipéptidos en condiciones iónicas y de pH adecuadas durante una duración suficiente para permitir la formación de complejo (es decir, conjugado), y concentrando o purificando opcionalmente dicho complejo. Los polipéptidos del complejo (es decir, conjugado) pueden formarse, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos según métodos convencionales; expresando cada polipéptido por separado en una célula o extracto celular, aislando y purificando después el polipéptido. Opcionalmente, el complejo de polipéptido terapéutico de la invención puede formarse expresando ambos polipéptidos i) y ii) en la misma célula o extracto celular, aislando y purificando después los complejos, por ejemplo, usando técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de afinidad con anticuerpos a la porción de linfocina, la porción de receptor de linfocina, o al complejo.

15 Ambos polipéptidos i) y ii) del conjugado también pueden unirse de manera covalente usando agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales o en una proteína de fusión.

20 Los agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales los conocen bien el experto así como métodos que los usan, e incluyen, como ejemplos, propionato de N-succinimidilo (2-piridilditio) (SPDP), (N-maleimido-metil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno).

30 El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína creada mediante la unión de dos o más genes que originalmente codificaron para proteínas diferentes. También se conoce como proteína quimérica. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales que se derivan de cada una de las proteínas originales. Se crean artificialmente proteínas de fusión recombinantes mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en terapéutica o investigación biológica. Una proteína de fusión recombinante es una proteína creada mediante modificación por ingeniería genética de un gen de fusión. Esto normalmente implica retirar el codón de terminación de una secuencia de ADNc que codifica para la primera proteína, después añadir la secuencia de ADNc de la segunda proteína en el marco mediante ligación o PCR de extensión de solapamiento. Esa secuencia de ADN se expresará entonces mediante una célula como una única proteína. La proteína puede modificarse por ingeniería genética para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o sólo una porción de cualquiera.

40 En una realización preferida, el conjugado es una proteína de fusión.

45 La secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma puede estar en una posición C-terminal o N-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la interleucina 15 o derivados de la misma está en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma.

50 La secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma y la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma pueden separarse mediante una primera secuencia de aminoácidos "ligadora". Dicha primera secuencia de aminoácidos "ligadora" puede ser de una longitud suficiente para garantizar que la proteína de fusión forma estructuras secundarias y terciarias.

55 La longitud de la primera secuencia de aminoácidos ligadora puede variar sin afectar significativamente a la actividad biológica de la proteína de fusión. Normalmente, la primera secuencia de aminoácidos ligadora comprende al menos uno, pero menos de 30 aminoácidos por ejemplo, un ligador de 2-30 aminoácidos, preferiblemente de 10-30 aminoácidos, más preferiblemente de 15-30 aminoácidos, todavía más preferiblemente de 15-25 aminoácidos, lo más preferiblemente de 18-22 aminoácidos.

60 Secuencias de aminoácidos ligadoras preferidas son aquellas que permiten que el conjugado adopte una conformación adecuada (es decir, una conformación que permite una actividad de transducción de señales adecuada mediante la ruta de señalización IL-15Rbeta/gamma).

65 Las primeras secuencias de aminoácidos ligadoras más adecuadas (1) adoptarán una conformación prolongada flexible, (2) no presentarán una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que podría interactuar con los dominios funcionales de proteínas de fusión, y (3) tendrán carácter hidrófobo o cargado mínimo que podría promover la interacción con los dominios de proteína funcionales.

Preferiblemente, la primera secuencia de aminoácidos ligadora comprende aminoácidos casi neutros seleccionados

del grupo que comprende Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) y Gln (Q), lo más preferiblemente del grupo que comprende Gly (G), Asn (N) y Ser (S).

Se describen ejemplos de secuencias ligadoras en las patentes estadounidenses n.ºs 5.073.627 y 5.108.910.

5 Los ligadores flexibles ilustrativos que son más particularmente adecuados para la presente invención incluyen los codificados por las secuencias de SEQ ID n.º: 13 (SGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQ), SEQ ID n.º: 14 (SGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG) o SEQ ID n.º: 15 (SGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ).

10 Preferiblemente, el conjugado tiene la secuencia SEQ ID n.º: 18 o SEQ ID n.º: 19.

Anticuerpo de la inmunocitocina de la invención

15 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina correspondiente a un tetrámero que comprende cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) idénticas (de aproximadamente 50-70 kDa cuando son de longitud completa) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (de aproximadamente 25 kDa cuando son de longitud completa) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada N-terminal (abreviada en el presente documento como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para IgG, IgD e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera N-terminal (abreviada en el presente documento como LCVR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según convenciones bien conocidas. La capacidad funcional del anticuerpo para unirse a un antígeno particular depende de las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada, y se determina ampliamente mediante las CDR.

35 El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal *per se*. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo quimérico y/o anticuerpo humanizado.

Ventajosamente, el término anticuerpo se refiere a una IgG, tal como IgG1, IgG2 (IgG2a o IgG2b), IgG3 e IgG4. Preferiblemente, el término anticuerpo se refiere a IgG1 o IgG2, y más preferiblemente a IgG2a.

40 "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo que está compuesto por regiones variables de una inmunoglobulina murina y de regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Esta alteración consiste simplemente en sustituir la región constante de un anticuerpo humano con la región constante murina, dando como resultado, por tanto, una quimera humana/murina que puede tener una inmunogenicidad suficientemente baja para que sea aceptable para uso farmacéutico. Ya se han notificado varios métodos para producir tales anticuerpos quiméricos, formando parte, por tanto, del conocimiento general del experto en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.225.539).

50 "Anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo que está compuesto parcial o completamente por secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR). Esta humanización de la región variable del anticuerpo y finalmente la CDR se realiza mediante técnicas que ya se conocen bien en la técnica. Como ejemplo, la solicitud de patente británica GB 2188638A y la patente estadounidense n.º 5.585.089 dan a conocer procedimientos en los que se producen anticuerpos recombinantes en los que la única porción del anticuerpo que se sustituye es la región determinante de complementariedad, o "CDR". La técnica de injerto de CDR se ha usado para generar anticuerpos que consisten en CDR murinas, y regiones constantes y regiones de entramado de región variable humana (véase, por ejemplo, RIECHMANN *et al.*, Nature, vol. 332, págs. 323-327, 1988). Estos anticuerpos conservan las regiones constantes humanas que son necesarias para la función efectora dependiente de Fc, pero es mucho menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria frente al anticuerpo. Como ejemplo, las regiones de entramado de las regiones variables se sustituyen por las correspondientes regiones de entramado humanas que dejan la CDR no humana sustancialmente intacta, o que incluso reemplazan la CDR por secuencias derivadas de un genoma humano. Se producen anticuerpos totalmente humanizados en ratones genéticamente modificados cuyos sistemas inmunitarios se han alterado para corresponderse con sistemas inmunitarios humanos. Tal como se mencionó anteriormente, es suficiente para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento, emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo fragmentos que representan formas de cadenas sencillas.

65 Un anticuerpo humanizado se refiere de nuevo a un anticuerpo que comprende una región de entramado humana, al

menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 85 o el 90%, preferiblemente al menos el 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativas. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada no abarcaría normalmente un anticuerpo quimérico de región variable de ratón/región constante humana. Como ejemplo, el diseño de inmunoglobulinas humanizadas puede llevarse a cabo tal como sigue: cuando un aminoácido se encuentra en de esta categoría, el aminoácido de región de entramado de una inmunoglobulina humana que va a usarse (inmunoglobulina aceptora) se reemplaza por un aminoácido de región de entramado de un CDR que proporciona inmunoglobulina no humana (inmunoglobulina donante): (a) el aminoácido en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es típico para inmunoglobulina humana en esa posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o (c) cualquier átomo de cadena lateral de un aminoácido de región de entramado está dentro de aproximadamente 5-6 angstrom (de centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional (QUEEN *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, págs. 2869, 1991). Cuando cada uno de los aminoácidos en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es inusual para inmunoglobulina humana en esa posición, un aminoácido de este tipo se reemplaza por un aminoácido típico para inmunoglobulina humana en esa posición.

El término "fragmento de anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo. Tales fragmentos pueden identificarse de manera sencilla por el experto y comprenden, como ejemplo, fragmento F_{ab} (por ejemplo, mediante digestión con papaína), fragmento F_{ab}' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina y reducción parcial), fragmento $F_{(ab)2}$ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), F_{ac} (por ejemplo, mediante digestión con plasmina), F_d (por ejemplo, mediante digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), y también fragmento scF_v (F_v de cadenas sencillas; por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular) están abarcados por la invención.

Tales fragmentos pueden producirse mediante escisión enzimática, técnicas de síntesis o recombinantes, tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento. También pueden producirse anticuerpos en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en los que uno o más codones de terminación se han introducido hacia 5' del sitio de terminación natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen de combinación que codifica para una porción de cadena pesada $F_{(ab)2}$ para que incluya secuencias de ADN que codifican para el dominio CH_1 y/o región bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos pueden unirse juntas químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como proteína contigua usando técnicas de modificación de ingeniería genética.

Preferiblemente, dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento scF_v .

El término "anticuerpo inmunomodulador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que actúa o bien:

1. 1) inhibiendo un receptor inmunosupresor tal como CTL-A4, PD-1, BTLA, LAG3, HAVCR2, ADORA2A o KIR inhibidores, o bien mediante unión a este receptor o su ligando, promoviendo por tanto la activación inmunitaria impidiendo señales de regulación por disminución; o bien
2. 2) estimulando un receptor coestimulador tal como CD40, CD137, CD134 o TNFRSF18 (GITR), promoviendo por tanto la activación de células T y/o NK.

En una primera realización preferida, el anticuerpo inmunomodulador inhibe un receptor inmunosupresor. Como ejemplo de anticuerpos inmunomoduladores que inhiben receptores inmunosupresores, pueden citarse CTL-A4, KIR inhibidores, BTLA, LAG3 HAVCR2, ADORA2A, y antagonistas de PD-1, y todavía preferiblemente antagonistas de PD-1 seleccionados de entre anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1.

Se descubrió CTL-A4 (antígeno asociado a linfocito citotóxico, también denominado CD 152) en 1987 (BRUNET *et al.*, Nature, vol. 328, págs. 267-270, 1987). El papel de CTL-A4 es principalmente inhibir la activación de células T y esto se mostró en ratones deficientes en CTL-A4 que padecían linfoproliferación masiva (CHAMBERS *et al.*, Immunity, vol. 7, págs. 8855-8959, 1997). Ahora, se ha mostrado que el bloqueo de CTL-A4 potencia respuestas de células T *in vitro* (WALUNAS *et al.*, Immunity, vol. 1, págs. 405-413, 1994) e *in vivo* (KEARNEY, J. Immunol, vol.155, p:1032-1036, 1995) y también aumenta la inmunidad antitumoral (LEACH, Science, vol. 271, págs. 1734-1736, 1996). Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a antagonistas de CTL-A4, puede citarse ipilimumab (también denominado MDX-010 y 10D1, disponible de MEDAREX, y comercializado como YERVOY™ por BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) dado a conocer en el documento WO 01/14424, ticilimumab (también conocido como 11.2.1 y CP-675.206) dado a conocer en el documento WO 00/37504, y también los anticuerpos CTL-A4 dados a conocer en las solicitudes de patente internacional WO 98/42752, WO 01/14424, WO 2004/035607 y WO 2012/120125, en los documentos EP 1212422 y EP 1262193, en las patentes estadounidenses n.^{os} US

5.811.097, US 5.855.887, US 5.977.318, US 6.051.227, US 6.207.156, US 6.682.736, US 6.984.720, US 7.109.003 y US 7.132.281.

La muerte celular programada 1 también conocida como PD-1 (también denominada como PDCD1 o CD279) es una glicoproteína de membrana de tipo I de ~55 kD. PD-1 es un receptor de la familia génica coestimuladora CD28, que se expresa de manera moderada en células T, B y NK sin tratamiento previo y se regula por incremento por la señalización de receptores de células T/B en linfocitos, monocitos y células mieloides. PD-1 tiene dos ligandos conocidos con perfiles de expresión distintos, PD-L1 (B7-H1), que se expresa ampliamente, es decir, en linfocitos sin tratamiento previo, en células B y T, monocitos y células dendríticas activadas, y PD-L2 (B7-DC), cuya expresión está restringida, es decir, en células dendríticas, macrófagos y monocitos activados y en células endoteliales vasculares. En varios modelos tumorales singénicos murinos, el bloqueo de o bien PD-1 o bien PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral o indujo regresión completa. Por tanto, la PD-1 se reconoce como un agente importante en la regulación inmunitaria y el mantenimiento de la tolerancia periférica. Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a antagonistas de PD-1, puede citarse nivolumab (también conocido como BMS-936558 o MDX1106; anticuerpo anti-PD-1, BRISTOL-MYERS SQUIBB) que se da a conocer en el documento WO2006/121168, Merck 3745 (también conocido como MK-3475 o SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1) que se da a conocer en el documento WO2009/114335, CT-01 1 (también conocido como hBAT o hBAT-1, anticuerpo anti-PD-1) que se da a conocer en el documento WO2009/101611, lambrolizumab que se da a conocer en el documento WO2008/156712, AMP514 que se da a conocer en los documentos WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828 y WO2010/098788, y también los anticuerpos dados a conocer en las solicitudes de patente internacional WO 2004/056875, WO 2006/056875, WO 2008/083174, WO2010/029434, WO2010/029435, WO2010/036959, WO2010/089411, WO2011/110604, WO2012/135408 y WO2012/145493. Dicho antagonista de PD-1 puede corresponder a un anticuerpo anti-PD-L1 tal como MDX-1 105 (también conocido como BMS-936559, anticuerpo anti-PD-L1) dado a conocer en el documento WO 2007/005874, o YW243.55.S70 (también conocido como MPDL3280A o RG7446; anticuerpo anti-PD-L1) dado a conocer en el documento WO 2010/077634.

Los receptores de tipo inmunoglobulina de células citolíticas (KIR) son una familia de proteínas de superficie celular encontradas en células importantes del sistema inmunitario denominadas células citolíticas naturales (NK). Regulan la función de destrucción de estas células interaccionando con moléculas de CMH de clase I, que se expresan en todos los tipos de células. Esta interacción les permite detectar células infectadas por virus o células tumorales que tienen un bajo nivel característico de CMH de clase I en su superficie. La mayoría de los KIR son inhibidores, lo que significa que su reconocimiento de CMH suprime la actividad citotóxica de su célula NK. Sólo un número limitado de KIR tienen la capacidad de activar una célula.

Los inhibidores de KIR tienen una cola citoplasmática larga que contiene el motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), que transduce señales inhibitoras a la célula NK tras el acoplamiento de sus ligandos de CMH de clase I. Los KIR inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL que comprenden KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DL3. Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a antagonistas de KIR inhibidores, puede citarse el anticuerpo 1-7F9 dado a conocer en el documento WO 2006/003179.

BTLA (atenuador de linfocitos B y T), también conocido como CD272, se induce durante la activación de células T, y sigue expresándose en células Th1 pero no células Th2. BTLA presenta inhibición de células T por medio de interacción con factor de necrosis tumoral (receptor), miembro 14 (TNFRSF14), también conocido como mediador de la entrada del virus del herpes (HVEM), TR2; ATAR; HVEA; CD270; LIGHTR. TNFRSF14 se identificó como un mediador celular de la entrada del virus del herpes simple (VHS). Se encontró que la región citoplasmática de este receptor se unía a varios miembros de la familia de TRAF, que pueden mediar en las rutas de transducción de señales que activan la respuesta inmunitaria. Finalmente, los complejos de BTLA/HVEM regulan negativamente respuestas inmunitarias de células T. Como ejemplo de antagonista de BTLA/HVEM, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en los documentos WO 2008/076560, WO 2010/106051 y WO 2011/014438.

LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos, también conocido como CD223) pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) y contiene 4 dominios de tipo Ig extracelulares. Como ejemplo de antagonistas de LAG3, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2010/019570.

HAVCR2 (receptor 2 celular del virus de la hepatitis A, también conocido como Tim-3, KIM-3; TIMD3; Tim-3; y TIMD-3) es una proteína de superficie celular específica de Th1 que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. HAVCR2 regula la activación de macrófagos e inhibe las respuestas auto y aloinmunitarias mediadas por Th1, promoviendo así la tolerancia inmunológica. Como ejemplo de antagonistas de HAVCR2, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2013/006490A.

ADORA2A (receptor de adenosina A_{2A}, también conocido como A_{2a}R, RDC8; o ADORA2) pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G) (GPCR), que se subdivide en clases y subtipos. Esta proteína desempeña un papel importante en muchas funciones biológicas, tales como ritmo cardíaco y circulación, flujo de sangre cerebral y renal, función inmunitaria, regulación del dolor y sueño. Se ha implicado en estados fisiopatológicos tales como enfermedades inflamatorias y trastornos

neurodegenerativos.

En una segunda realización preferida, el anticuerpo inmunomodulador estimula a un receptor coestimulador.

- 5 Como ejemplo de anticuerpos inmunomoduladores que estimulan receptores coestimuladores, pueden citarse CD40, CD137, CD134 y agonistas de TNFRSF18.

10 CD40 es un miembro la superfamilia de receptores de TNF encontrado en APC, que se requiere para su activación. Se ha encontrado que este receptor es esencial en la mediación de una amplia variedad de respuestas inmunitarias e inflamatorias incluyendo cambio de clase de inmunoglobulina dependiente de células T, y desarrollo de células B de memoria.

15 Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a agonistas de CD40, pueden citarse los dados a conocer en el documento WO 03/040170, en el documento WO 2005/063981, en el documento WO 2005/063289 y en el documento WO 2012/041635.

20 CD137 es un miembro de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF). Sus nombres alternativos son *miembro 9 de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral* (TNFRSF9), *4-1BB* y *activación inducida por linfocitos* (ILA). CD137 puede expresarse por células T activadas, pero en un mayor grado en células T CD8 que en CD4. Además, se encuentra expresión de CD137 en células dendríticas, células dendríticas foliculares, células citolíticas naturales, granulocitos y células de paredes de vasos sanguíneos en sitios de inflamación. La actividad mejor caracterizada de CD137 es una actividad coestimuladora para células T activadas. La reticulación de CD137 potencia la proliferación de células T, la supervivencia de la secreción de IL-2 y la actividad citolítica. Además, puede potenciar la actividad inmunitaria eliminando tumores en ratones.

25 Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a agonistas de CD137, pueden citarse urelumab (también conocido como BMS-663513), y los anticuerpos dados a conocer en los documentos WO 03/040170, WO 2004/010947, en los documentos WO 2005/035584, WO 2006/126835 y en el documento WO 2012/145183.

30 CD134, también conocido como OX40, es un miembro de la superfamilia de TNFR de receptores. OX40 es una molécula coestimuladora, cuya expresión de OX40 es dependiente de la activación completa de la célula T. OX40 se une a receptores en células T, impidiendo que mueran y aumentando posteriormente la producción de citocinas. OX40 tiene un papel crítico en el mantenimiento de una respuesta inmunitaria más allá de los primeros pocos días y en adelante a una respuesta de memoria debido a su capacidad para potenciar la supervivencia.

35 Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a agonistas de CD134, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2009/079335, en los documentos WO 2012/027328, WO 2013/038191 y en el documento WO 2013/028231.

40 El miembro 18 de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFRSF18) también conocido como receptor de la familia de TNFR inducible por activación (AITR) o proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR) es un miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF-R). Esta proteína es una molécula receptora de superficie que se ha mostrado que está implicada en la inhibición de la actividad supresora de células T reguladoras y la extensión de la supervivencia de células T efectoras.

45 Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a agonistas de TNFRSF18, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2006/105021 y en el documento WO 2011/028683.

50 Tanto un conjugado como un anticuerpo o fragmento del mismo pueden unirse covalentemente usando agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales o en una proteína de fusión.

55 El experto conoce bien métodos de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales y se han dado a conocer anteriormente. Como ejemplo, el experto puede usar el método dado a conocer en TILL *et al.* (Proc. Natl. Acad. U.S.A., vol. 86(6), págs.: 1987-91, 1989).

En una realización preferida, la inmunocitocina es una proteína de fusión.

60 En otra realización preferida, la inmunocitocina es un complejo que comprende un conjugado entre los polipéptidos i) y ii), en la que el polipéptido i) o ii) se fusiona con un anticuerpo o fragmento del mismo.

El polipéptido i), el polipéptido ii) o el conjugado pueden estar en una posición C-terminal o N-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento del mismo.

65 Preferiblemente, el conjugado es una proteína de fusión y la secuencia de aminoácidos del conjugado está en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento del mismo, lo más preferiblemente en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos de al menos una de la

región constante de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de la misma.

La secuencia de aminoácidos del conjugado y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de la misma pueden estar separadas o no por una segunda secuencia de aminoácidos "ligadora".

5 En una realización particular, la inmunocitocina de la invención es una proteína de fusión en la que el conjugado y el anticuerpo o fragmento del mismo no están separados por ningún ligador.

10 Como para la primera secuencia de aminoácidos ligadora, dicha segunda secuencia de aminoácidos "ligadora" puede ser de una longitud suficiente para garantizar que la proteína de fusión forma estructuras secundarias y terciarias apropiadas.

15 La longitud de la primera secuencia de aminoácidos ligadora puede variar sin afectar significativamente a la actividad biológica de la proteína de fusión. Normalmente, la primera secuencia de aminoácidos ligadora comprende al menos uno, pero menos de 30 aminoácidos por ejemplo, un ligador de 2-30 aminoácidos, preferiblemente de 10-30 aminoácidos, más preferiblemente de 15-30 aminoácidos, lo más preferiblemente de 15-25 aminoácidos.

20 Como para la primera secuencia de aminoácidos ligadora, las segundas secuencias de aminoácidos ligadoras más adecuadas (1) adoptarán una conformación prolongada flexible, (2) no presentarán una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que podría interactuar con los dominios funcionales de proteínas de fusión y (3) tendrá características hidrófobas o cargadas mínimas que podrían promover la interacción con los dominios de proteína funcionales.

25 Preferiblemente, la segunda secuencia de aminoácidos ligadora comprende un aminoácido casi neutro seleccionado en el grupo que comprende Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) y Gln (Q), lo más preferiblemente en el grupo que comprende Gly (G), Asn (N) y Ser (S).

30 Como ejemplo de una segunda secuencia de aminoácidos ligadora que es adecuada para la presente invención, puede citarse la secuencia SEQ ID nº: 16 (SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG) o SEQ ID nº: 17 (AAGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA).

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped recombinantes

35 En un segundo aspecto la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para una inmunocitocina tal como se describió anteriormente, preferiblemente una inmunocitocina correspondiente a una proteína de fusión.

Dicho ácido nucleico corresponde a ARN o ADN, preferiblemente a ADN.

40 Según una realización preferida, el ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención está operativamente unido a una secuencia de expresión génica, que dirige la expresión del ácido nucleico dentro de una célula procarionota o eucariota, preferiblemente dentro de una célula eucariota. La "secuencia de expresión génica" es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación de promotor-potenciador, que facilita la transcripción y traducción eficaces del ácido nucleico de la inmunocitocina a la que está operativamente unido. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible.

50 Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de beta-actina, promotor de creatina cinasa muscular, promotor de factor de elongación humano y otros promotores constitutivos. Los promotores virales a modo de ejemplo que funcionan de manera constitutiva en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores de virus de simios (por ejemplo, SV40), virus del papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (VSR), virus de la hepatitis B (VHB), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos los conocen los expertos habituales en la técnica.

60 Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, la metalotiona en el promotor se induce para promover la transcripción y traducción en presencia de determinados iones metálicos. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores inducibles.

65 En general, la secuencia de expresión génica incluirá, según sea necesario, secuencias que no se transcriben en 5' y que no se traducen en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de ocupación de extremos, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias que no se transcriben en 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico operativamente unido. Las secuencias de expresión génica incluyen

opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en el sentido de 5' según se desee. Tal como se usa en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención y la secuencia de expresión génica se dice que están "operativamente unidas" cuando se unen de manera covalente de tal modo que se coloca la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia que codifica para inmunocitocina de la invención bajo la influencia o el control de la secuencia de expresión génica.

Se dice que dos secuencias de ADN están operativamente unidas si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica en 5' da como resultado la transcripción de la inmunocitocina de la invención y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN (1) no da como resultado la introducción de una mutación del marco de lectura, (2) no interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de la inmunocitocina de la invención o (3) no interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para traducirse en una proteína. Por tanto, una secuencia de expresión génica estaría operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención si la secuencia de expresión génica pudiera efectuar la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico de manera que el transcrito resultante se traduzca para dar el polipéptido deseado.

Ventajosamente, dicha secuencia de ácido nucleico comprende un intrón, puesto que se ha demostrado a menudo que moléculas de pre-ARNm mejoran los rendimientos de producción de moléculas recombinantes. Puede usarse cualquier secuencia de intrón, y como ejemplo, pueden citarse las dadas a conocer en ZAGO *et al.* (Biotechnol. Appl. Biochem., vol. 52(Pt 3), págs.: 191-8, 2009) y en CAMPOS-DA-PAZ *et al.* (Mol. Biotechnol., vol. 39(2), págs.: 155-8, 2008).

El ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención puede suministrarse *in vivo* solo o en asociación con un vector.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente.

En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo que pueda facilitar la transferencia del ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, fagémidos, episomas, cromosomas artificiales, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado por la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de inmunocitocina.

Los vectores de plásmido son un tipo preferido de vector y se han descrito extensamente en la técnica y los conocen bien los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, SAMBROOK *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Los ejemplos no limitativos de plásmidos incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript, y otros plásmidos los conocen bien los expertos habituales en la técnica. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos de ADN específicos.

Preferiblemente, el vector de ácido nucleico puede incluir marcadores seleccionables que son activos tanto en bacterias como en células de mamífero.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped modificada por ingeniería genética con el ácido nucleico o con el vector descrito anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped modificada por ingeniería genética" se refiere a células huésped que se han transducido, transformado o transfectado con el ácido nucleico o con el vector descrito anteriormente.

Como ejemplos representativos de células huésped apropiadas, pueden citarse células bacterianas, tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levadura, células de insecto tales como Sf9, células animales tales como CHO o COS, células vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera que está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas en el presente documento.

Preferiblemente, la célula huésped modificada por ingeniería genética es una célula animal, y lo más preferiblemente una célula CHO-S (INVITROGEN, n.º de cat. 11619-012).

Se usan frecuentemente células de ovario de hámster chino (CHO) en la industria biofarmacéutica para la fabricación de productos biológicos tales como proteínas recombinantes, anticuerpos, peptidocuerpos y ligandos de receptores. Uno de los motivos por los que se usan células CHO a menudo es que estas células tienen un registro de seguridad extenso para la producción de productos biológicos. Se considera que es una línea celular bien caracterizada y, como resultado, las pruebas de seguridad requeridas pueden ser menos rigurosas en algunos

sentidos (por ejemplo, seguridad retroviral) que las requeridas para otros tipos de células. No obstante, la producción de interleucina 15 es muy difícil, especialmente en esta célula.

La introducción del ácido nucleico o del vector descrito anteriormente en la célula huésped puede realizarse mediante métodos bien conocidos para un experto en la técnica tales como transfección con fosfato de calcio; transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación.

También se proporciona en el contexto de la presente invención un método de producción de una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa una inmunocitocina según la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico o un vector tal como se describió anteriormente en una célula huésped, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped modificada por ingeniería genética recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicha inmunocitocina. Tales células huésped recombinantes pueden usarse para la producción de inmunocitocina de la invención.

Composición farmacéutica que comprende la inmunocitocina de la invención

Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la inmunocitocina tal como se describió anteriormente, un ácido nucleico que codifica para la misma o un vector que comprende dicho ácido nucleico, finalmente asociado con un portador farmacéuticamente aceptable.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente reacciones no deseadas alérgicas o similares, tales como molestias gástricas, mareo y similares cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que puede aprobarla una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "portador" se refiere a un disolvente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

La composición farmacéutica comprende una "cantidad eficaz" de la inmunocitocina de la invención, cantidad eficaz que es suficiente para inhibir el crecimiento de células cancerosas, preferiblemente suficiente para inducir la regresión del crecimiento tumoral. Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante o alternativamente de la duración deseada del tratamiento. Naturalmente, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente del estado que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del sujeto, etc. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis preferida puede adaptarse al sujeto individual, tal como entiende y puede determinar un experto en la técnica, sin experimentación excesiva.

En vista de la eficacia marcada de la inmunocitocina de la invención, el experto puede planear usar dosis muy pequeñas para tratar a un sujeto. Como ejemplo no limitativo, la inmunocitocina de la invención puede administrarse mediante inyección a una dosis comprendida entre 50 mg/kg y 5 µg/kg de sujeto, preferiblemente a una dosis comprendida entre 10 mg/kg y 100 µg/kg y lo más preferiblemente a una dosis comprendida entre de 2,5 mg/kg y 500 µg/kg.

Como ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administraciones tópica, oral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular, intratumoral o subcutánea y similares. Preferiblemente, la composición farmacéutica contiene vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación prevista para inyectarse. Estos pueden ser en particular disoluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente secadas por congelación que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

La inmunocitocina de la invención, los ácidos nucleicos que codifican para la misma o los vectores de ácido nucleico pueden solubilizarse en un tampón o agua o incorporarse en emulsiones, microemulsiones, hidrogeles (por ejemplo hidrogeles a base de copolímeros de tribloque de PLGA-PEG-PLGA), en microesferas, en nanoesferas, en micropartículas, en nanopartículas (por ejemplo poli(ácido láctico-co-glicólico), micropartículas (por ejemplo poli(ácido láctico) (PLA); poli(lactida-co-ácido glicólico) (PLGA); microesferas de poliglutamato, nanoesferas, micropartículas o nanopartículas), en liposomas u otras formulaciones galénicas. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y fluida hasta el grado de una jeringabilidad aceptable. Debe ser estable en las condiciones de

fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

5 Pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como sales de base libre o farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclados con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa.

10 También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

15 Las inmunocitocinas según la invención pueden formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

20 El portador puede ser también un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Las inmunocitocinas de la invención también pueden modificarse, mediante pegilación como ejemplo, para aumentar su biodisponibilidad. Cuando la inmunocitocina de la invención tiene una forma de ácido nucleico, el portador puede ser también un vector, tal como un virus (por ejemplo MVA, rAAV, lentivirus, etc.).

25 La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ocasionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

30 Puede ocasionarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina, polioles y formulaciones covalentes y no covalentes potenciadoras de la semivida.

35 Hay numerosas causas de inestabilidad o degradación de péptidos, incluyendo hidrólisis y desnaturalización. La interacción hidrófoba puede provocar el agrupamiento de moléculas entre sí (es decir, agregación). Pueden añadirse estabilizadores para reducir o prevenir tales problemas.

40 Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y derivados de la misma (véase la patente estadounidense n.º 5.730.969). También pueden añadirse conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final. Puede añadirse a la formulación un estabilizador seleccionado de tensioactivos iónicos y no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-galacturónico, trehalosa, dextranos, hidroxietilalmidones, y mezclas de los mismos. La adición de sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar un péptido. El péptido puede estabilizarse también poniéndolo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido condroitinsulfúrico, almidón, glucógeno, dextrina y sal de ácido alginico.

45 Otros azúcares que pueden añadirse incluyen monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar, y mezclas de los mismos (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un péptido, y son miscibles con agua o solubles en agua. Polioles adecuados pueden ser polihidroxicoholes, monosacáridos y disacáridos incluyendo manitol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, vinilpirrolidona, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa, y polímeros de los mismos.

50 Diversos excipientes pueden también estabilizar péptidos, incluyendo albúmina sérica, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes de metales, polivinilpirrolidona, gelatina hidrolizada y sulfato de amonio.

55 La promesa de la terapia con citocinas se deriva de hecho de la identificación de estas citocinas novedosas pero incluso más fundamentalmente, el campo se beneficia enormemente de la cantidad siempre en expansión de datos preclínicos que demuestran convincentemente efectos biológicos sinérgicos y/o novedosos, que pueden lograrse a través del uso de varias combinaciones de citocinas con capacidades estimulantes inmunitarias complementarias. Las combinaciones de posibles agentes activos terapéuticos con inmunocitocinas a base de RLI incluyen por ejemplo agentes quimioterápicos, agentes antiangiogénicos o agentes inmunomoduladores.

60 En una realización preferida, la composición de la invención pueden comprender un agente activo terapéutico adicional, tal como agentes quimioterápicos, agentes antiangiogénicos o agentes inmunomoduladores.

65 Para agentes quimioterápicos, se ha demostrado que sus efectos terapéuticos podrían estar mediados en parte por un efecto indirecto sobre respuestas inmunitarias, o bien induciendo una muerte celular inmunogénica, equilibrando los entornos inmunosupresores, reduciendo el tumor grande primario y luego facilitando el ataque inmunitario o bien

induciendo una linfopenia transitoria seguida por linfoproliferación homeostática. Muchos de ellos los conoce bien el experto y, como ejemplo de agente quimioterápico que puede combinarse con la inmunocitocina de la invención, puede citarse fludarabina, gemcitabina, capecitabina, metotrexato, taxol, taxotere, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiaurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbina, etopósido, tenipósido, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, L-asparaginasa, doxorubicina, epimbicina, 5-fluorouracilo, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, leucovorina, levamisol, irinotecán, estramustina, etopósido, mostazas de nitrógeno, BCNU, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina, mesilato de imatinib, hexametilamina, topotecán, inhibidores de cinasa, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de ATPasa, tirfostinas, inhibidores de proteasa, inhibidores de herbimicina A, genisteína, erstatina y lavendustina A.

Para agentes antiangiogénicos, se ha demostrado que tienen efectos fuera de la diana sobre el sistema inmunitario y entonces podrían facilitar respuestas inmunitarias frente a tumores. Como ejemplo de agente antiangiogénico que puede combinarse con la inmunocitocina de la invención, pueden citarse fármacos que seleccionan como diana el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) por medio de su tirosina cinasa, tal como sorafenib, sunitinib y pazopanib, o la diana de mamíferos de rapamicina (mTOR), tal como temsirolimús y everolimús.

Para agentes inmunomoduladores que pueden combinarse con la inmunocitocina de la invención, pueden citarse citocinas (IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, IL18, IL-21, GM-CSF, G-CSF, IFN α ,...), quimiocinas/citocinas antiangiogénicas (IP10, Mig, SDF-1, RANTES,...), agonistas de TLR y anticuerpos inmunorreguladores (anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-TGF β , agonista anti-CD40,...).

Métodos terapéuticos y usos

También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, preferiblemente de una composición farmacéutica que comprende una inmunocitocina tal como se describió anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino o un primate, y lo más preferiblemente un ser humano.

También se proporciona en el presente documento

1. (i) una inmunocitocina tal como se describió anteriormente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para la misma, o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo, y

2. (ii) un agente terapéutico, preferiblemente un agente anticancerígeno,

como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o estado al que tal término se aplica, o uno o más síntomas de tal trastorno o estado. La expresión "tratar el cáncer" tal como se usa en el presente documento significa la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente tal tratamiento también conduce a la regresión del crecimiento tumoral, es decir, la disminución del tamaño de un tumor medible. Lo más preferiblemente, tal tratamiento conduce a la regresión completa del tumor.

Preferiblemente dicho cáncer es un carcinoma o un cáncer de pulmón.

Lo más preferiblemente, la expresión "tratar el cáncer" significa "tratar el cáncer activando linfocitos infiltrados en el tumor".

Por consiguiente, el cáncer corresponde preferiblemente a un cáncer vascularizado.

Todavía preferiblemente, dicho cáncer es un cáncer con una población de TIL anérgica, correspondiendo dicho cáncer a cáncer avanzado tal como carcinoma de células renales (CCR).

A continuación, la invención se describe en más detalle con referencia a secuencias de aminoácidos, secuencias de ácido nucleico y ejemplos. Sin embargo, no se pretende ninguna limitación de la invención mediante los detalles de los ejemplos.

Ejemplos

1) de modulocinas basadas en RLI

Construcción de inmunocitocinas RLI anti-PD-1 (hBAT)

Un plásmido de expresión que codifica para la cadena ligera anti-PD-1 (correspondiente a la de CT-01 1 (hBAT o hBAT-1). Las secuencias de cadena pesada de IgG quiméricas del anticuerpo se diseñaron para fusionarse en el extremo 3' con o sin un ligador de 22 aminoácidos (SEQ ID n°: 16) a IL15 (SEQ ID n°: 3, en la que el aminoácido en la posición 93 es K). Estas secuencias de nucleótidos se sintetizaron y clonaron en plásmidos pcDNA3.1 por GENEART. La secuencia completa de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo anti-PD-1 se da a conocer en la solicitud de patente internacional WO2009/101611.

Preparación de ADN de plásmido y reactivo de transfección

Se obtuvo un PEI lineal de 40 kDa de POLISCIENCE. Se preparó una disolución madre 1 mg/ml disolviendo el PEI en agua con calentamiento, neutralización por NaOH y esterilización por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La disolución madre se alícuotó y almacenó a -20°C.

Se purificó el ADN de los plásmidos para transfecciones usando los kits de purificación de plásmidos siguiendo el protocolo del fabricante (MACHEREY-NAGEL) y esterilizando por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

Producción y purificación de las inmunocitocinas1-Transfección transitoria en suspensión:

Se sembraron células CHO-S (INVITROGEN) mantenidas de manera rutinaria a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio PowerCHO2 (LONZA) y se cultivaron durante la noche a 37°C en un incubador con agitación (100 rpm) con el 5% de CO₂. Para la transfección, se diluyeron entonces las células hasta 2×10^6 células/ml en medio CD-CHO (INVITROGEN). Se prepararon los complejos de transfección en el 10% del volumen de cultivo usando NaCl 150 mM. Se mezcló el ADN de los constructos de expresión (2,5 mg/l de volumen de cultivo, usando una razón 1:2 de plásmido que codifica para cadena pesada con respecto a plásmido que codifica para cadena ligera) con PEI diluido en NaCl (10 mg/l de volumen de cultivo final) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente antes de añadir al cultivo. Se cultivaron las células en un incubador con agitación (130 rpm) a 37°C durante 5 h antes de doblar el volumen de cultivo con medio PowerCHO2. Se recogió el sobrenadante 5 días después de la transfección.

2-Transfección estable en células adherentes

Se hicieron crecer células CHO-K1 (ATCC n.º CCL-61) en DMEM suplementado con 1-glutamina, FCS al 10% y penicilina (100 unidades/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) y se transfectaron cada vector usando reactivo lipofectamina 2000 (INVITROGEN), según recomienda el fabricante. Se seleccionaron clones mediante dilución límite con medio que contenía geneticina e higromicina (0,5 mg/ml) o blasticina e higromicina (5 µg/ml y 100 µg/ml) para ICK anti-GD2O-acetilado e ICK anti-CD20, respectivamente. Se sometió a ensayo el sobrenadante de cultivo de cada clon para determinar la producción de proteínas bifuncionales mediante ELISA. Para la producción de ICK, se amplificaron los clones seleccionados en medio DMEM al 25% y medio AIM al 75% (INVITROGEN). Las células se mantuvieron entonces en el 100% de AIM, y se recogió el sobrenadante y se reemplazó cada 2 días, durante 10 días.

3-Purificación de sobrenadante:

Se centrifugó el sobrenadante recogido a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se equilibró a pH 7,8 con NaOH y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Los medios condicionados se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando una columna de proteína A (GE) según las instrucciones del fabricante. Las proteínas purificadas se concentraron con unidades de AMICON de 50 kDa (MILLIPORE). Durante esta etapa, se reemplazó el tampón de elución por PBS. Las proteínas purificadas se sometieron a ensayo finalmente mediante ELISA y se midió la absorbancia a 280 nm. Se evaluó la pureza mediante electroforesis.

4-Detección del resto de inmunoglobulina mediante ELISA.

Se recubrió una placa de microtitulación de fondo plano Maxisorp (NUNC) con 100 µl de anticuerpo de cabra anti-ser humano (UP892370, INTERCHIM) diluido en PBS a 1,5 µg/ml durante h a 4°C. Se bloqueó después la placa con 200 µl de tampón de bloqueo (BSA al 1% + TWEEN 20 al 0,1% en PBS) durante 1 h a 37°C. Se lavó entonces la placa 3 veces con tampón de lavado (TWEEN 20 al 0,1% en PBS) y se añadió la muestra diluida en tampón de bloqueo y se incubó 30 min a 37°C (100 µl). Después de 3 lavados, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana conjugado con peroxidasa (109-036-003, JACKSON) diluido 1:10000 y se incubó durante 30 min a 37°C. Se usó sustrato TMB (INTERCHIM) para determinar los niveles de proteína y se leyeron las placas a 450 nm. Se usó rituximab purificado (ROCHE) para generar una curva patrón en la placa.

5-Detección del resto de citocina mediante ELISA.

Se recubrió una placa de microtitulación de fondo plano Maxisorp (NUNC) con 100 μ l del B-E29 anti-IL15 (DIACLONE) diluido en tampón carbonato hasta 2 μ g/ml durante 16 h a 4°C. Se bloqueó después la placa con 200 μ l de tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 1 h a 37°C. Se lavó entonces la placa tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS). Se añadió la muestra diluida en TBS+BSA al 0,05% y se incubó 1 h 30 min a 37°C (100 μ l). Después de 3 lavados, se añadió anticuerpo BAM 247 anti-IL15 biotinilado (R&D SYSTEM) diluido hasta 200 ng/ml y se incubó durante 1 h 30 min a 37°C. Se lavó la placa 3 veces y se añadió dilución 1:1000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Se usó sustrato TMB (INTERCHIM) para determinar los niveles de proteína y se leyeron las placas a 450 nm. Se usó IL-15 (PEPROTECH) para generar una curva patrón en la placa.

Fenotipos de TIL

Se obtuvieron linfocitos infiltrados en el tumor (TIL) a partir de biopsias o tejidos de nefrectomías derivados de 2 pacientes con carcinoma de células renales después de digestión con ADNasa y colagenasa. Estos TIL eran mayoritariamente anérgicos permitiendo la progresión tumoral.

Se determinó mediante inmunofluorescencia el fenotipo de estos TIL en relación con PD-1, Tim-3 e IL-15R α .

La figura 1 muestra el fenotipo obtenido para el paciente A (figura 1A) y para el paciente B (figura 1B).

Actividad de unión de las inmunocitocinas

Se evaluó la unión específica de la modulocina RLI anti-PD-1 mediante citometría de flujo. Se sometió a prueba la capacidad de la modulocina para unirse al receptor de IL-15 en células efectoras en el kit 225. La modulocina recubierta sobre células seleccionadas como diana se reveló con un AcM de cabra anti-IgG humana conjugado con PE (PN IM0550, BECKMAN COULTER), o con un anticuerpo de ratón anti-IL15 biotinilado (BAM247, R&D SYSTEM) acoplado con PE-estreptavidina (SIGMA-ALDRICH). Se incubaron células seleccionadas como diana (1×10^5) con cada ICK durante 1 h a 4°C, se lavaron y entonces se incubaron un conjugado de PE durante 1 h a 4°C. Se analizaron finalmente las células lavadas en un instrumento FACSCALIBUR (BECTON DICKINSON).

Los resultados han mostrado que la modulocina se une al receptor de IL-15 y también a PD-1.

Actividad de proliferación de las inmunocitocinas

Se sometió a prueba la actividad de proliferación mediada por interleucina-15 de la modulocina obtenida y se comparó con RLI. Se midieron las respuestas proliferativas del kit 225 y células 32D β a ICK mediante incorporación de [³H]-timidina. Las células se mantuvieron en medio de cultivo durante 3 días, se lavaron dos veces y se sometieron a privación en medio sin citocina durante 24 h o 4 h para kit 225 y 32D β , respectivamente. Entonces se sembraron en placas de múltiples pocillos a 10^4 células/pocillo en 100 μ l y se cultivaron durante 48 h en medio suplementado con concentración creciente de muestra. Se usaron RLI y rIL-15 de ser humano como calibrador. Se pulsaron las células durante 16 h con 0,5 μ Ci/por pocillo de [³H]-timidina, se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio y se midió la radiactividad asociada a células. Los resultados han confirmado que la actividad de proliferación de la modulocina era comparable a la de RLI.

Reactivación de TIL fuerte mediante la modulocina RLI

Se obtuvieron linfocitos infiltrados en el tumor (TIL) a partir de biopsias o tejidos de nefrectomías derivados de 25 pacientes con carcinoma de células renales después de digestión con ADNasa y colagenasa. Estos TIL fueron mayoritariamente anérgicos permitiendo la progresión tumoral.

Se sometió a prueba la reactivación de TIL a partir de los 25 pacientes incubando dichos TIL en ausencia o en presencia de la misma molaridad para cada paciente de RLI, HBAT (CT011 = anticuerpo anti-PDI), HBAT-RLI (modulocina), o de la combinación de HBAT y RLI. RLI se usó a 1 μ g/ml para los pacientes 1-8 y luego a 300 ng/ml para los pacientes 9-25.

Se recogieron los sobrenadantes 48 horas después de estimulación y se determinó la reactivación midiendo mediante ELISA la concentración de IFN γ en el sobrenadante.

Se presentan en la tabla 1 los datos sin procesar de los 25 TIL derivados de los pacientes con carcinoma de células renales, excepto para los TIL no estimulados, que siempre secretaban menos de 20 pg/ml de IFN γ .

Combinación

Tabla 1

Paciente	pg/ml de IFN γ .			
	RLI	HBAT	HBAT-RLI	HBAT+RLI
1	440	0	1070	ND
2	267	0	338	ND
3	365	28	2000	377
4	150	92	2280	1500
5	290	ND	7700	2900
6	570	80	970	700
7	0	0	0	0
8	15	15	32	25
9	320	17	1570	360
10	245	0	635	245
11	260	320	2000	1490
12	310	22	1100	360
13	170	160	3600	1800
14	0	9	50	0
15	840	27	2500	1000
16	15	73	0	50
17	0	0	0	0
18	125	55	800	230
19	170	0	4500	0
20	0	33	330	0
21	80	0	395	0
22	125	65	1500	1000
23	0	0	0	0
24	30	65	2500	540
25	390	ND	3600	ND

La figura 2 muestra la media y la mediana de IFN γ producido a partir de TIL activados con RLI, HBAT, HBAT-RLI y HBAT+RLI (* p < 0,05).

5 Los resultados muestran que casi no se obtiene activación de TIL con el anticuerpo anti-PDI solo. Se obtuvo algo de activación de TIL con RLI solo o combinado con el anticuerpo anti-PDI. Ahora, y sorprendentemente, se obtuvo una activación fuerte y general en comparación con RLI y también RLI+HBAT con la inmunocitocina de la invención (tabla 1 y figura 2).

10 Estos resultados permiten concebir nuevas terapias.

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental de carcinoma CT26

15 CT26 es una línea celular de carcinoma de colon de ratón indiferenciada, inducida por n-nitroso-n-metiluretano (nmu).

Se les inyectarán por vía subcutánea a ratones BALB/C en el costado derecho células tumorales CT26 ($2 \cdot 10^5$ /ratón).

20 El día 9, cuando los tumores deben alcanzar 20-30 mm², se tratan grupos de ratones diferentes con 16 ó 32 μ g/ratón de la modulocina anti-PDI-RLI sola en comparación con concentraciones equimolares de concentraciones del anti-PDI solo, el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PDI y RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan la modulocina o RLI solos desde el día 9 dos veces a la semana durante 4 semanas. El anticuerpo anti-PDI solo se inyecta desde el día 9 y entonces una vez a la semana durante 4 semanas. En el grupo de combinación,

el anticuerpo anti-PD-1 se inyecta desde el día 9 y entonces una vez a la semana durante 4 semanas y RLI desde el día 15 y entonces dos veces a la semana durante 3 semanas. Los tumores se miden tres veces por semana con un calibre y se calculó el área tumoral tal como sigue: longitud x anchura. Los ratones se sacrifican cuando el tamaño del tumor alcanza 300 mm² o se ulceran. Se evaluarán el crecimiento tumoral primario, la supervivencia y finalmente la regresión. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI).

Se les inyectaron por vía subcutánea en el costado derecho a ratones BALB/C células tumorales CT26 (2.10⁵/ratón). El día 9, cuando los tumores alcanzaron 20-30 mm², se trataron los ratones por vía i.p. con 16 ó 32 µg/ratón de la modulocina anti-PD-LI-RLI sola en comparación con concentraciones equimolares del anti-PD-LI (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) solo, el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PD-LI (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) y RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan la modulocina o RLI solos desde el día 9 dos veces a la semana durante 4 semanas. El anticuerpo anti-PDI solo se inyecta desde el día 9 y entonces una vez a la semana durante 4 semanas. En el grupo de combinación, el anticuerpo anti-PD-1 se inyecta desde el día 9 y entonces una vez a la semana durante 4 semanas y RLI desde el día 15 y entonces dos veces a la semana durante 3 semanas. Los tumores se miden tres veces por semana con un calibre y se calculó el área tumoral tal como sigue: longitud x anchura. Los ratones se sacrifican cuando el tamaño del tumor alcanza 300 mm² o se ulceran. Se evaluarán el crecimiento tumoral primario, la supervivencia y finalmente la regresión. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI).

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental tc-1 de pulmón

Se derivó la línea celular tumoral, TC-1, de células epiteliales pulmonares primarias de ratones C57B1/6. Se immortalizaron las células con el vector de retrovirus anfitriónico 1xsn16e6e7 y se transformaron posteriormente con el plásmido pvejb que expresa el oncogén c-ha-ras humano activado. Las células son positivas para la expresión de HPV-16 E7.

Se les inyectó a ratones C57B1/6 por vía subcutánea en el costado derecho células tumorales TC-1 (1.10⁵/ratón). El día 9, cuando los tumores deben alcanzar 20-50 mm², se tratan diferentes grupos de ratones con 16 ó 32 µg/ratón, de la modulocina anti-PD1-RLI sola en comparación con concentraciones equimoleculares del anti-PD1 solo, el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PDI y RLI o PBS en el grupo de control. La modulocina o RLI sola se inyecta desde el día 9 dos veces a la semana durante 4 semanas. El anticuerpo anti-PD-1 solo se inyecta desde el día 9 y entonces una vez a la semana durante 4 semanas. En el grupo de combinación, el anticuerpo anti-PD-1 se inyecta desde el día 9 y entonces una vez a la semana durante 4 semanas y RLI desde el día 15 y entonces dos veces a la semana durante 3 semanas. Los tumores se miden tres veces por semana con un calibre y se calculó el área tumoral tal como sigue: longitud x anchura. Se sacrifican los ratones cuando el tamaño tumoral alcanza 300 mm² o se ulceran. Se evalúan el crecimiento tumoral primario, la supervivencia y finalmente la regresión.

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental B16F10 de melanoma metastásico

Se implantan tumores B16F10 mediante inyección de 3 x 10⁴ células B16F10 en el costado de ratones C57BL/6, i.d. el día 0. Después de permitir injertarse a las células tumorales, se inicia la terapia el día 4. La modulocina anti-PD-LI-RLI se inyecta por vía i.p. a 16 ó 32 µg/ratón en comparación con concentraciones equimolares del anti-PD-L1 solo (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PD-L1 ((clon 10 F.9G2, BIO-XCELL)) y RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan la modulocina, el AcM anti-PD-L1, RLI o la combinación de AcM anti-PD-L1 + RLI desde el día 4 dos veces a la semana durante 4 semanas. Los tumores se miden tres veces por semana con un calibre y se calculó el área tumoral tal como sigue: longitud x anchura. Se sacrifican los ratones cuando el tamaño tumoral alcanza 300 mm² o se ulceran. Se evalúan el crecimiento tumoral primario, la supervivencia y finalmente la regresión. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI).

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental MB49 de cáncer de vejiga avanzado

Se origina la línea celular tumoral MB49 de un tumor inducido por carcinógeno de origen epitelial de vejiga de ratones macho C57BL/6. Se inyectaron 10⁶ células de cáncer de vejiga MB49 por vía s.c. dentro de la dermis superior en el lomo de ratones C57BL/6. El tratamiento se inicia el día 6 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores pasan a ser claramente visibles y palpables a un tamaño de ≈ 15 mm². Las modulocinas anti-PD-1-RLI y anti-PD-L1 se inyectan por vía i.p. a 16 ó 32 µg/ratón en comparación con concentraciones equimolares del anti-PD1 solo, el anti-PD-L1 solo (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PD1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) con RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan las modulocinas, el AcM anti-PD-1, el AcM anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI y la

combinación de AcM anti-PD-1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI desde el día 6 dos veces a la semana durante 4 semanas. Los tumores se miden tres veces por semana con un calibre y se calculó el área tumoral tal como sigue: longitud x anchura. Se sacrifican los ratones cuando el tamaño tumoral alcanza 300 mm² o se ulceran. Se evaluarán el crecimiento tumoral primario, la supervivencia y finalmente la regresión. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI).

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental 4T1 de cáncer de mama

Se les inocularon a ratones BALB/c 5 x 10⁴ células de cáncer de mama 4T1 en la glándula mamaria el día 0. El tratamiento se inicia el día 10 después de la inoculación tumoral que corresponde a cuando los tumores llegan a ser claramente visibles y palpables a un tamaño de ≈ 15-20 mm². Las modulocinas anti-PD-1-RLI y anti-PD-L1 se inyectan por vía i.p. a 16 ó 32 µg/ratón en comparación con concentraciones equimolares del anti-PD1 solo, el anti-PD-L1 solo (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PD1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) con RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan las modulocinas, el AcM anti-PD-1, el AcM anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI y la combinación de AcM anti-PD-1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI desde el día 10 dos veces a la semana durante 4 semanas. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI). Los tumores se miden tres veces por semana con un calibre y se calculó el área del tumor tal como sigue: longitud x anchura. Los ratones se sacrificaron el día 27. Los nódulos metastásicos en el pulmón se cuentan bajo un microscopio binocular.

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental ID8 de cáncer de ovario

Se desarrolló previamente la línea celular de carcinoma de ovario ID8-VEGF a partir de una línea celular de adenocarcinoma seroso papilar epitelial de ovario de ratón. Se les implantó a ratones C57BL/6 por vía subcutánea en el costado derecho 5 x 10⁶ células tumorales ID8. El tratamiento se inicia el día 10 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores pasan a ser claramente visibles y palpables a un tamaño de ≈ 15-20 mm². Se inyectan por vía i.p. las modulocinas anti-PD-1-RLI y anti-PD-L1 a 16 ó 32 µg/ratón en comparación con concentraciones equimolares del anti-PD1 solo, el anti-PD-L1 solo (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PD1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) con RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan las modulocinas, el AcM anti-PD-1, el AcM anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI y la combinación de AcM anti-PD-1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI desde el día 10 dos veces a la semana durante 4 semanas. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI). Los tumores se midieron tres veces por semana con un calibre y se calculó el área del tumor tal como sigue: longitud x anchura. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceraron.

Evaluación de la eficacia de la modulocina en el modelo tumoral experimental RM-1 de cáncer de próstata

Se les inocularon a ratones C57BL/6 hembra por vía s.c. 2 x 10⁵ células de cáncer de próstata murino RM-1. El tratamiento se inicia el día 3 después de la inoculación tumoral que corresponde a cuando los tumores llegan a ser claramente visibles y palpables a un tamaño de ≈ 15-20 mm². Se inyectan por vía i.p. las modulocinas anti-PD-1-RLI y anti-PD-L1 a 16 ó 32 µg/ratón en comparación con concentraciones equimolares del anti-PD1 solo, el anti-PD-L1 solo (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), el RLI solo (1004-14p), la combinación entre anti-PD1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) con RLI o PBS en el grupo de control.

Se inyectan las modulocinas, el AcM anti-PD-1, el AcM anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL), RLI y la combinación de AcM anti-PD-1 o anti-PD-L1 (clon 10 F.9G2, BIO-XCELL) + RLI desde el día 3 dos veces a la semana durante 4 semanas. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo o conjugado de RLI-anticuerpo irrelevante (anti-HER2-RLI). Los tumores se midieron tres veces por semana con un calibre y se calculó el área del tumor tal como sigue: longitud x anchura. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceraron.

Lista de secuencias

<110> CYTUNE Universite Paris Descartes APHP BECHARD, David TARTOUR, Eric GEY, Alain
 <120> Modulocinas basadas en un dominio sushi de IL-15 e IL-15Ra
 <130> CYT-B-0005-PCT1
 <150> 13003963.9
 <151> 8-8-2013
 <160> 19
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1

- <211> 114
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 5 <223> secuencia consenso de interleucina 15 de mamífero
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> X= N, S, T o I
- 10 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> X= V, H, I, Q o E
- <220>
- 15 <221> MISC_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> X= N, Y, F o D
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 20 <222> (6)..(6)
- <223> X= I o R
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- 25 <223> X= S, N, L, Y, K o R
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (10)..(10)
- <223> X= K, E, R o Q
- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (11)..(11)
- <223> X= K, T o R
- <220>
- 35 <221> MISC_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> X= E, D o Q
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 40 <222> (14)..(14)
- <223> X= D, H, S o N
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (16)..(16)
- 45 <223> X= I o T
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (17)..(17)
- <223> X=Q, R o K
- 50 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (18)..(18)
- <223> X= S o F
- <220>
- 55 <221> MISC_FEATURE
- <222> (19)..(19)
- <223> X= M, I o L
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 60 <222> (21)..(21)
- <223> X= I, V o M
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (23)..(23)
- 65 <223> X=A o T
- <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X=E o D
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> X= D o G
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (31)..(31)
 <223> X= V, F, A o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 15 <223> X= S, N o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> X= V o I
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)..(39)
 <223> X= A o T
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> X= K, Q o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (48)..(48)
 <223> X= Q, G, R, H o E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 35 <223> X= S o L
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> X= L, Q o H
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> X= S, F o Y
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= G, K, S, N o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (56)..(56)
 <223> X= D, H, S o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(57)
 55 <223> X= A, H, M, E, G, S o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> X= S, V, P, T, N o D
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> X= I o L
 <220>
 65 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(60)

<223> X= H, S, K, N, Y o E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 5 <223> X= D o E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (62)..(62)
 <223> X= T, I o A
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> X= V o I
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (64)..(64)
 <223> X= E, T, Q, R o K
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (66)..(66)
 <223> X= L o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (67)..(67)
 25 <223> X= I, T o L
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> X=I, M, F, Y o L
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> X= N, T, R, D o S
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X= S, N, R, T o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (75)..(75)
 <223> X= S o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 45 <223> X= S o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(77)
 <223> X= N, I o K
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (78)..(78)
 <223> X= G, E o K
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> X= N, Y, D o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (80)..(80)
 <223> X= V, K o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (81)..(81)
 65 <223> X= T, A o I
 <220>

ES 2 690 046 T3

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (83)..(83)
<223> X= S, L o T
<220>
5 <221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> X= E o V
<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> X= E o K
<220>
15 <221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(94)
<223> X= K o R
<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<222> (95)..(95)
<223> X= N, T o S
<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<222> (96)..(96)
<223> X= I o F
<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> X= K, N, A, o T
<220>
35 <221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X= Q, K o E
<220>
40 <221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)
<223> X= V, I o K
<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> X= H o R
<220>
50 <221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)
<223> X= N o Y
<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<222> (113)..(113)
<223> X= = T, S, P, L o A
<220>
60 <221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(114)
<223> X= = S o P
<400> 1
Xaa Trp Xaa Xaa Val Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

```

ES 2 690 046 T3

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

- Xaa Xaa
- <210> 2
- <211> 114
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia consenso de interleucina 15 de primates
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10 <222> (1)..(1)
- <223> X = N o I
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- 15 <223> X = N o D
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (10)..(10)
- <223> X = K o R
- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (11)..(11)
- <223> X = K o R
- <220>
- 25 <221> MISC_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> X = E o Q
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 30 <222> (16)..(16)
- <223> X = I o T
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (19)..(19)
- 35 <223> X = M o I
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (30)..(30)
- <223> X = D o G
- 40 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (31)..(31)
- <223> X = V o I
- <220>
- 45 <221> MISC_FEATURE
- <222> (34)..(34)

<223> X = S o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 5 <223> X = L o H
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X = G o N
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 <223> X = D o N
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(57)
 <223> X = A o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (58)..(58)
 <223> X = S, N o D
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(60)
 25 <223> X = H o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> X = V o I
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (67)..(67)
 <223> X = I o L
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> X = N o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (73)..(73)
 <223> X = S o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 45 <223> X = S o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> X = N o T
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(80)
 <223> X = V o I
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> X = E o K
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (112)..(112)
 <223> X = N o Y
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 65 <223> X = T o A
 <400> 2

ES 2 690 046 T3

Xaa Trp Val Xaa Val Ile Ser Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Asp Leu Xaa
1 5 10 15

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

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

Val Ile Ser Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Asp Thr Xaa Glu
50 55 60

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

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

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

Xaa Ser

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

<222> (93)..(93)

<223> X= E o K

10 <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser

<210> 4

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia consenso de dominio sushi de mamíferos

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (3)..(3)

ES 2 690 046 T3

```

<223> X= P o A
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
5 <223> X= M o V
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X= V o I
10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 13)..(13
<223> X= W, R o Q
<220>
15 <221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X= S o N
<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (19)..(19)
<223> X= L o V
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
25 <223> X= Y, H o N
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> X= I o V
30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> X= S o T
<220>
35 <221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> X=T o I
<220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (45)..(45)
<223> X=T o I
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
45 <223> X= L o I
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> X= A o N
50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> X= V o A
<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
<223> X= H o Y
<400> 4

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Xaa
1 5 10 15

Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys
20 25 30
60

```

ES 2 690 046 T3

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn Lys Xaa
 35 40 45

Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

- <210> 5
- <211> 64
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia consenso de dominio sushi de mamíferos ampliada
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10 <222> (1)..(1)
- <223> X= T, V o I
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (5)..(5)
- 15 <223> X= P o A
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X= M o V
- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (9)..(9)
- <223> X= V o I
- <220>
- 25 <221> MISC_FEATURE
- <222> (15)..(15)
- <223> X= W, R o Q
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 30 <222> (18)..(18)
- <223> X= S o N
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (21)..(21)
- 35 <223> X=L o V
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (22)..(22)
- <223> X=Y, H o N
- 40 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (28)..(28)
- <223> X= I o V
- <220>
- 45 <221> MISC_FEATURE
- <222> (41)..(41)
- <223> X= S o T
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 50 <222> (43)..(43)
- <223> X= T o I
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (47)..(47)
- 55 <223> X= L o I
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (50)..(50)
- <223> X= A o N
- 60 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (53)..(53)

ES 2 690 046 T3

<223> X= V o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 5 <223> X= H o Y
 <400> 5
 Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

 Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn
 35 40 45

 Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 <210> 6
 <211> 61
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso de dominio sushi de primates
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X= P o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (5)..(5)
 <223> X= M o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 25 <223> X= W, R o Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> X= Y o H
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> X= I o V
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> X= V o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A
 <400> 6
 Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Ser
 1 5 10 15

 Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30

 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 35 40 45

 Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60
 <210> 7
 45 <211> 63

ES 2 690 046 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso de dominio sushi de primates ampliada
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X= V o I
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X= P o A
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X= M o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 20 <223> X= W, R o Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> X= Y o H
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X= I o V
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X=V o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X=H o Y
 <400> 7
 Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

 Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

 Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60
 <210> 8
 40 <211> 61
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8
 Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
 1 5 10 15

 Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30

 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 35 40 45

 Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

ES 2 690 046 T3

<210> 9
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 9
 Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 <210> 10
 <211> 77
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso de dominios y sushi de mamíferos
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X= T, V o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (5)..(5)
 <223> X= P o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 25 <223> X= M o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X= V o I
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> X= W, R o Q
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X= S o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (21)..(21)
 <223> X= L o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 45 <223> X= Y, H o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X= I o V
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> X= S o T
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> X= T o I
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> X= L o I
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X=A o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 15 <223> X= H o Y
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> x= H o Y
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> X=A, S o L
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (70)..(70)
 <223> X= V, A, S o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (71)..(71)
 <223> X= H o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 35 <223> X= Q o H
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X= R, S o K
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> X= A, V o P
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> x= P o S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (77)..(77)
 <223> X= P o T
 <400> 10

ES 2 690 046 T3

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro xaa Ser xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
 65 70 75

<210> 11

<211> 77

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia consenso de dominios y sushi de primates

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(1)

<223> X= V o I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

15 <223> X= P o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X= M o V

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X= W, R o Q

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> X= Y o H

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (28)..(28)

<223> X= I o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

35 <223> X= V o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> X= H o Y

40 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> X= A, S o L

<220>

45 <221> MISC_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> X= V, A o T

<220>

<221> MISC_FEATURE

50 <222> (71)..(71)

<223> X= H o R

<220>

ES 2 690 046 T3

<221> MISC_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> X= A o V

<400> 11

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

5 Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Gln Arg Pro Xaa Pro Pro
65 70 75

<210> 12

<211> 77

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 12

Ile Thr Cys Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

15 Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro
65 70 75

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligador peptídico

<400> 13

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

20 Gly Ser Leu Gln
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> ligador peptídico

<400> 14

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

30 Gly Ser Gly Gly
20

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

ES 2 690 046 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ligador peptídico
 <400> 15
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

5 Gly Gly Ser Leu Gln
 20
 <210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ligador peptídico
 <400> 16
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 20
 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ligador peptídico
 <400> 17
 Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Ala
 20
 <210> 18
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RLI1
 <400> 18
 Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu
 85 90 95

Gln Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 100 105 110

ES 2 690 046 T3

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 115 120 125

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 195 200 205

Asn Thr Ser
 210

<210> 19

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RLI2

<400> 19

Ile Thr Cys Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95

Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 100 105 110

ES 2 690 046 T3

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
115 120 125

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
195 200 205

Asn Thr Ser
210

REIVINDICACIONES

1. Inmunocitocina que comprende:
 - 5 a) un conjugado, y
 - b) un anticuerpo inmunomodulador, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, unido directa o indirectamente mediante covalencia a dicho conjugado,
 - 10 en el que dicho anticuerpo inmunomodulador o fragmento del mismo
 - a. inhibe un receptor inmunosupresor y se selecciona del grupo que comprende antagonistas de CTLA-4, antagonistas de KIR inhibidores, antagonistas de BTLA, antagonistas de LAG3, antagonistas de HAVCR2, antagonistas de ADORA2A y antagonistas de PD-1, o
 - 15 b. estimula un receptor coestimulador y se selecciona del grupo que comprende agonistas de CD40, agonistas de CD137, agonistas de CD134 y agonistas de TNFRSF18, en el que dicho conjugado comprende:
 - 20 (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina-15 o derivados de la misma que tiene al menos el 10% de la actividad de interleucina-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y
 - 25 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de la IL-15R α o derivados de la misma que tiene al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a interleucina-15 humana.
2. Inmunocitocina según la reivindicación 1, en la que dicho derivado de interleucina 15 tiene al menos el 25% de la actividad de interleucina-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, más preferiblemente al menos el 50%, o
 - 35 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92,5% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID n^o: 1, SEQ ID n^o: 2, SEQ ID n^o: 3, preferiblemente de al menos el 96%, y más preferiblemente de al menos el 98,5% o de al menos el 99%.
3. Inmunocitocina según la reivindicación 1, en la que dicho derivado del dominio sushi de la IL-15R α tiene al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 50% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana, o
 - 40 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92% con una secuencia de aminoácidos en el grupo que consiste en SEQ ID n^o: 4, SEQ ID n^o: 5, SEQ ID n^o: 6, SEQ ID n^o: 7, SEQ ID n^o: 8, y SEQ ID n^o: 9, preferiblemente de al menos el 96%, y más preferiblemente de al menos el 98%.
4. Inmunocitocina según la reivindicación 3, en la que dicho anticuerpo inmunomodulador que inhibe un receptor inmunosupresor se selecciona de entre antagonistas de CTLA-4, preferiblemente ipilimumab o ticilimumab.
5. Inmunocitocina según la reivindicación 3, en la que dicho anticuerpo inmunomodulador que inhibe un receptor inmunosupresor se selecciona de entre antagonistas de KIR inhibidores, preferiblemente 1-7F9.
6. Inmunocitocina según la reivindicación 3, en la que dicho anticuerpo inmunomodulador que inhibe un receptor inmunosupresor se selecciona de entre antagonistas de PD-1, preferiblemente nivolumab, Merck 3745 o CT-01 1 (también conocido como hBAT).
7. Inmunocitocina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que
 - 55 a) los polipéptidos i) y ii) del conjugado se unen de manera covalente en una proteína de fusión; y
 - 60 b) dicho conjugado y el anticuerpo o fragmento del mismo se unen de manera covalente en una proteína de fusión.
8. Inmunocitocina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha interleucina-15 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n^o: 1.

9. Inmunocitocina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el dominio sushi de IL-15R α tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n $^{\circ}$: 4.
- 5 10. Inmunocitocina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el polipéptido (ii) que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de la IL-15R α o derivados de la misma tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n $^{\circ}$: 12.
- 10 11. Inmunocitocina según la reivindicación 7, en el que dicho conjugado comprende la secuencia de aminoácidos de la interleucina-15 o derivados de la misma en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de la IL-15R α o derivados de la misma, y en la que la secuencia de aminoácidos del conjugado está en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento del mismo
- 15 12. Ácido nucleico que codifica para una inmunocitocina tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Vector que comprende un ácido nucleico tal como se define en reivindicación 12.
- 20 14. Célula huésped modificada por ingeniería genética con el ácido nucleico según la reivindicación 12, o con el vector según la reivindicación 13, preferiblemente dicha célula huésped es una célula animal y lo más preferiblemente una célula CHO.
- 25 15. Composición farmacéutica que comprende la inmunocitocina tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el ácido nucleico según la reivindicación 12, o el vector según la reivindicación 13, asociada opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable, en la que dicha composición farmacéutica es preferiblemente para tratar cáncer en un sujeto, preferiblemente un cáncer avanzado tal como carcinoma de cáncer renal (CCR).

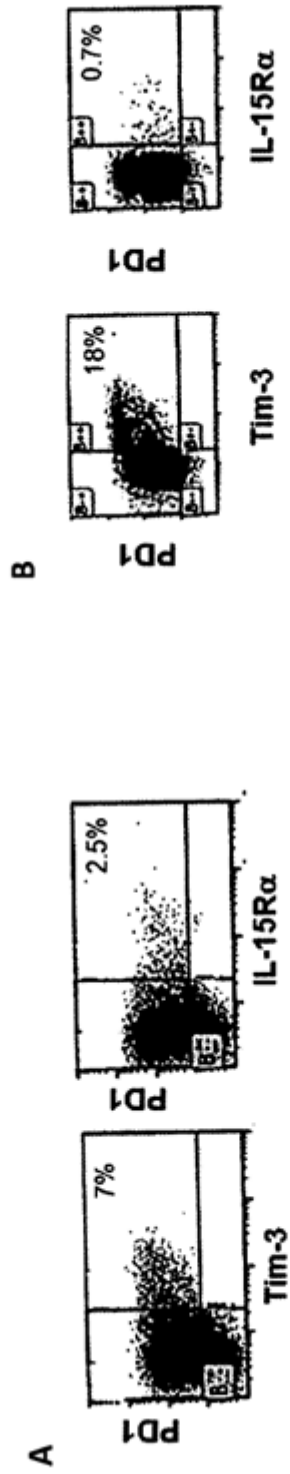


Figura 1

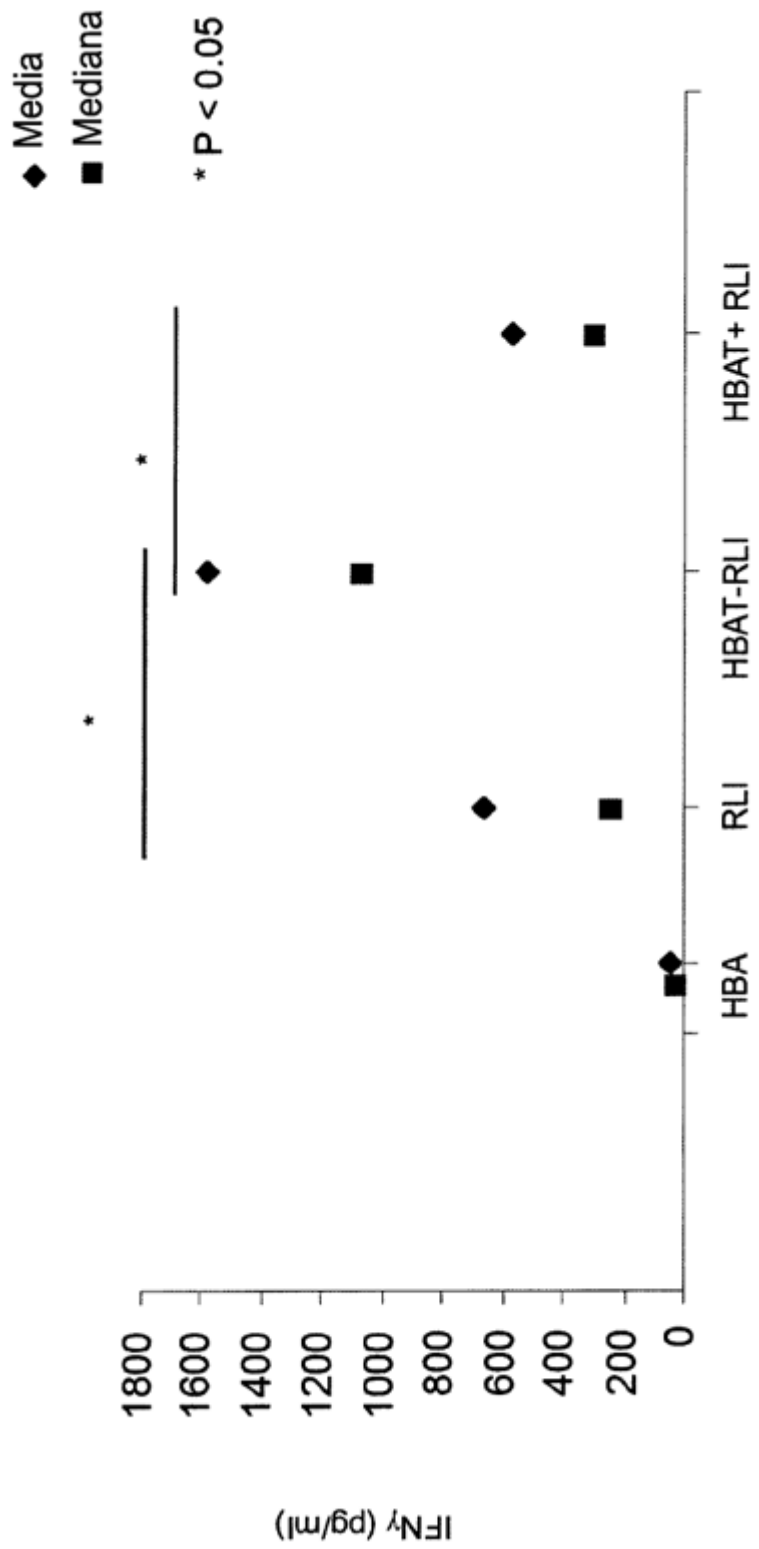


Figura 2