

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 180**

51 Int. Cl.:

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013 PCT/EP2013/050787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107791**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013 E 13701014 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2804877**

54 Título: **Citocinas de haz alfa-helicoidal mutantes dirigidas**

30 Prioridad:

20.01.2012 EP 12305075

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2018

73 Titular/es:

**VIB VZW (16.7%)
Rijvisschestraat 120
9052 Ghent, BE;
UNIVERSITEIT GENT (16.7%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (16.7%);
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (16.7%);
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL
UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (16.7%) y
UNIVERSITÄT OSNABRÜCK (16.7%)**

72 Inventor/es:

**TAVERNIER, JAN;
UZÉ, GILLES;
CARTRON, GUILLAUME;
PAUL, FRANCIANE y
PIEHLER, JACOB**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 694 180 T3

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

DESCRIPCIÓN

Citocinas de haz alfa-helicoidal mutantes dirigidas

5 La presente invención se refiere a una citocina de haz α -helicoidal modificada, con actividad reducida a través de un receptor de citocina de haz α -helicoidal, donde dicha citocina de haz α -helicoidal se administra específicamente a las células diana. Preferentemente, dicha citocina de haz α -helicoidal es un mutante, más preferentemente es un interferón mutante, con baja afinidad por el receptor de interferón, donde dicho interferón mutante se administra específicamente a las células diana. El direccionamiento se realiza mediante la fusión de la citocina de haz α -helicoidal modificada con un resto de direccionamiento, preferentemente un anticuerpo. La invención se refiere además al uso de dicha citocina de haz α -helicoidal modificada dirigida para tratar enfermedades. Una realización preferida es el uso de un interferón mutante dirigido, para tratar enfermedades, preferentemente enfermedades virales y tumores.

15 Las citocinas son pequeñas proteínas que juegan un papel importante en la comunicación intercelular. Las citocinas se pueden clasificar basándose en su estructura, siendo el grupo más grande la familia de haces de cuatro hélices α . Esta familia puede, basándose en el uso de receptores, dividirse adicionalmente en las subfamilias de interferón (IFN) e interleucina (IL) -2, -3, -10 y -12. Las citocinas de haz helicoidal son importantes como posible producto biofarmacéutico para el tratamiento de enfermedades humanas; como ejemplo no limitativo, la eritropoyetina se usa para el tratamiento de la anemia o la deficiencia de glóbulos rojos, la somatotropina para el tratamiento de la deficiencia de la hormona del crecimiento y la interleucina-2 en el tratamiento del cáncer.

Dentro de las citocinas de haz helicoidal α , los IFN de tipo I pertenecen a una familia de citocinas que tienen funciones biológicas importantes. En los seres humanos, hay 17 IFN de tipo I diferentes (13α , β , ϵ , κ , ω) que señalizan a través de un receptor de superficie celular expresado de forma ubicua compuesto por dos cadenas IFNAR1 e IFNAR2. El ensamblaje del complejo IFN-receptor inicia la activación de varias vías de transducción de señales que, dependiendo del tipo de célula, modifican la diferenciación celular y/o las funciones.

Al actuar en prácticamente todos los tipos de células, el IFN tipo I puede evitar una infección viral productiva. Además, muestra marcados efectos antiangiogénicos y proapoptóticos. Los IFN tipo I también están profundamente implicados en la regulación de varias funciones de la inmunidad innata y adaptativa, así como en la homeostasis ósea. Actúa particularmente sobre la activación/diferenciación de células dendríticas y osteoclastos. El sistema IFN tipo I es, de hecho, de importancia crítica para la salud de los mamíferos.

35 Los estudios preclínicos en ratones han establecido una notable eficacia del IFN tipo I para el tratamiento de enfermedades virales o tumorales. Cabe destacar que los ratones curados de un tumor experimental mediante el tratamiento con IFN se encontraron inmunizados contra el tumor inicial, lo que sugiere que el IFN actúa no solo para comprometer los procedimientos de rechazo del tumor, sino también para romper la tolerancia inmunitaria contra el tumor. Sobre la base de estos estudios, el IFN α fue aprobado en la clínica para el tratamiento tanto de la infección viral como del cáncer. Más recientemente, se demostró que el IFN3 es eficaz en la esclerosis múltiple remitente recurrente y también se aprobó para esta patología. Desafortunadamente, la eficacia clínica de IFN se encontró a menudo decepcionante y, en la actualidad, otras estrategias terapéuticas, como los compuestos antivirales específicos, las quimioterapias y los anticuerpos monoclonales, cuando es posible, han suplantado ampliamente la amplia aplicación de IFN. Hoy en día, IFN es la opción terapéutica de primera línea para infecciones crónicas de VHB y VHC y para un número limitado de tumores.

La eficacia del IFN tipo I en la práctica clínica está limitada por una dosificación ineficaz debido a una toxicidad sistémica y efectos secundarios significativos, que incluyen síndrome gripal, depresión, hepatotoxicidad, enfermedad autoinmune, disfunción tiroidea y pérdida de peso. Por lo tanto, valdría la pena dirigir la actividad de IFN solo hacia la población celular que debe tratarse con IFN (por ejemplo, un órgano infectado o masa tumoral) o activarse por IFN (por ejemplo, subconjuntos de células inmunitarias).

Con el fin de resolver o limitar la toxicidad sistémica de las citocinas, se ha propuesto el direccionamiento específico de citocinas por proteínas de fusión anticuerpo-citocina (Ortiz-Sanchez y col., 2008). Rossi y col. (2009) describe específicamente el IFN α tetramérico dirigido a CD20 y su uso en el tratamiento del linfoma de células B. Sin embargo, la fusión mantiene su actividad biológica, y es incluso más activa que el IFN pegilado comercial, lo que significa que los efectos secundarios no deseados en el tratamiento humano todavía estarían presentes, o incluso serían más graves. La patente WO2009039409 describe el IFN dirigido y sus actividades apoptóticas y antitumorales. La solicitud de la patente describe la fusión de un anticuerpo como un resto de direccionamiento con IFN de tipo silvestre, pero también con IFN mutado. Sin embargo, se indica que el fragmento de IFN debe conservar

su actividad endógena a un nivel de al menos el 80 %, o incluso a un nivel más alto que el IFN de tipo silvestre. También en este caso, la fusión conserva los efectos secundarios no deseados del tipo silvestre.

La patente WO2008/124086 describe proteínas de fusión de un elemento de direccionamiento y un IFN mutante.

5

Sorprendentemente, los investigadores han encontrado que una citocina de haz α -helicoidal modificada, con una afinidad disminuida por el receptor de citocinas de haz α -helicoidal y la consiguiente disminución de la bioactividad específica se puede fusionar con un resto de direccionamiento, donde la bioactividad se restaura hacia las células dirigidas, pero no hacia las células que no están dirigidas por la construcción. Dicha construcción tiene la ventaja sobre la técnica de tener menos efectos secundarios, especialmente una toxicidad sistémica menor, mientras conserva la bioactividad contra las células diana.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 Un primer aspecto de la descripción es una construcción de direccionamiento, que comprende citocina de haz α -helicoidal modificada, caracterizada por una afinidad reducida por el receptor de citocina de haz α -helicoidal, y un resto de direccionamiento. Las citocinas del haz α -helicoidal son conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan, citocinas similares a cardiotrofinas NNT-1, factor neurotrófico ciliar, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos , cardiotrofina-1, eritropoyetina, ligando FLT3, somatotropina, interferón α -1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 20 16, 17, 21, interferón β , interferón γ , interferón κ , interferón ϵ , interferón τ -1, interferón ω -1, interleucina 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 cadena α , 13, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28A, 29, 31, factor de células madre, leptina, factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, prolactina y trombopoyetina. Para una revisión de las citocinas de haz α -helicoidal, véase Conklin (2004). Una citocina de haz α -helicoidal modificada significa que la citocina de haz α -helicoidal se ha modificado para alterar la afinidad al receptor, con el resultado final de que la citocina de haz α -helicoidal modificada tiene una afinidad reducida por el receptor y la consiguiente reducción de la actividad biológica, en comparación con la citocina de tipo silvestre endógena que se une normalmente al receptor. Dicha modificación es una mutación que disminuye la afinidad de la citocina de haz α -helicoidal. Una afinidad reducida y la consiguiente actividad biológica reducida, como se usa en este caso, significa que la citocina de haz α -helicoidal modificada tiene una actividad biológica de menos del 70 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal, incluso más preferentemente menos del 60 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal, más preferentemente menos del 50 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal, más preferentemente menos del 40 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal, más preferentemente menos del 30 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal, más preferentemente menos del 20 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal, lo más preferentemente menos del 10 % de la actividad biológica de la citocina de haz α -helicoidal en comparación con la citocina de haz α -helicoidal que normalmente se une al receptor. Preferentemente, la citocina de haz α -helicoidal modificada es una mutante de la citocina de haz α -helicoidal de tipo silvestre y la actividad se compara con la citocina de haz α -helicoidal de tipo silvestre. La afinidad y/o la actividad pueden medirse por cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. Preferentemente, la actividad se mide midiendo y cuantificando la fosforilación de STAT.

La construcción de direccionamiento de la invención es un IFN α 2 humano mutante caracterizado por una afinidad reducida por el receptor de IFN y un resto de direccionamiento. Un IFN α 2 humano mutante como se usa en este caso es una forma mutante que tiene una afinidad más baja por el receptor y, como consecuencia, una actividad antiproliferativa más baja y/o una actividad antiviral más baja. De hecho, como lo muestran Piehler y col. (2000), la afinidad relativa se correlaciona directamente con la actividad antiproliferativa relativa y con la actividad antiviral relativa. La afinidad del IFN α 2 humano mutante con el receptor, en comparación con la afinidad del IFN α 2 humano de tipo silvestre con el receptor, se puede medir mediante espectroscopia de interferencia reflectométrica en condiciones de flujo continuo, como lo describen Brecht y col. (1993). El mutante puede ser un mutante puntual, una 50 eliminación o un mutante de inserción, o una combinación de los mismos. Preferentemente, dicho IFN α 2 humano mutante se obtiene mediante mutagénesis activa, tal como, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa. Dicho IFN α 2 humano mutante tiene una actividad biológica de menos del 70 % de la actividad biológica del IFN α 2 de tipo silvestre, incluso más preferentemente menos del 60 % de la actividad biológica del IFN α 2 de tipo silvestre, más preferentemente menos del 50 % de la actividad biológica del IFN α 2 silvestre, más preferentemente menos del 40 % de la actividad biológica del IFN α 2 silvestre, más preferentemente menos del 30 % de la actividad biológica del IFN α 2 silvestre, más preferentemente menos del 20 % de la actividad biológica del IFN α 2 silvestre, lo más preferentemente, menos del 10 % de la actividad biológica del tipo silvestre del que se deduce (es decir, el IFN α 2 humano de tipo silvestre del que se ha mutado la secuencia codificante para obtener el IFN α 2 humano mutante). Las formas mutantes de IFN α 2 son conocidas por los expertos 60 en la materia. Como ejemplo no limitativo, los mutantes de IFN α 2 se han enumerado en Piehler y col. (2000). Dicho

mutante IFN α 2 está mutado en uno o más aminoácidos de la región 144-154, preferentemente en la posición 148, 149 y/o 153, incluso más preferentemente, dicho IFN α 2 mutante se selecciona de entre el grupo que consiste en IFN α 2 L153A, IFN α 2 R149A e IFN α 2 M148A. Más preferentemente, dicho mutante se selecciona de entre el grupo que consiste en IFN α 2 L153A e IFN α 2 R149A.

5 Preferentemente, dicho receptor es IFNAR2.

Dicho resto de direccionamiento se dirige a un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en Her2, DC-STAMP, PDL2 y CD20.

10 Un resto de direccionamiento, como se usa en este caso, es un dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH). Preferentemente, dicho resto de direccionamiento consiste en una única cadena polipeptídica y no se modifica después de la traducción. Aún más preferentemente, dicho resto de direccionamiento es un nanocuerpo.

15 La construcción de direccionamiento puede ser cualquier construcción de direccionamiento conocida por el experto en la materia. Como un ejemplo no limitante, el resto de direccionamiento puede unirse químicamente al interferón mutante, o puede ser una proteína de fusión recombinante. Preferentemente, dicha construcción de direccionamiento es una proteína de fusión recombinante. El resto de direccionamiento se puede fusionar
20 directamente al IFN mutante, o se puede fusionar con la ayuda de un fragmento enlazador. El resto de direccionamiento se puede fusionar en el extremo aminoterminal o en el extremo carboxiterminal del IFN mutado; preferentemente, dicho resto de direccionamiento se fusiona en la extremidad aminoterminal de la molécula de IFN mutada.

25 Otro aspecto de la invención es una construcción de direccionamiento de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

Otro aspecto de la invención es una construcción de direccionamiento de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

30 Otro aspecto más de la invención es una construcción de direccionamiento de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad viral. Como ejemplo no limitativo, dicha enfermedad viral puede ser una infección por VIH, una infección por VHB o una infección por VHC.

35 Otro aspecto más de la invención es una construcción de direccionamiento de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades que comportan degradación ósea, tales como, pero no limitadas a, osteoporosis.

También se describe una composición farmacéutica, que comprende una construcción de direccionamiento de acuerdo con la invención y un excipiente adecuado. Está claro para el experto en la materia que una composición
40 farmacéutica de este tipo puede usarse sola o en un tratamiento de combinación, tal como, pero no limitadas a, una combinación con quimioterapia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 Figura 1: Representación de los elementos estructurales de la proteína de fusión nanocuerpo-IFN.

Figura 2: Actividad de luciferasa de luciérnaga inducida por la preparación de IFN indicada en células HL116 (paneles A y B) o células HL116 que expresan el receptor de leptina murino (mLR) (paneles C y D). Los paneles A y C, por un lado, y los paneles B y D, por otro lado, se generaron en dos experimentos separados. Por consiguiente, solo es posible la comparación vertical (panel A versus panel C o panel B versus panel D).

50 Figura 3: Actividad de luciferasa de Renilla (gris claro) y de luciérnaga (gris oscuro) inducida por el nanocuerpo-IFN α 2R149A o por el IFN α 2 (7pM) en un cocultivo 1:1 de células que expresan el receptor de leptina y una luciferasa de luciérnaga inducible por IFN o en células que expresan una luciferasa de renilla inducible por IFN pero desprovistas de receptor de leptina. Las actividades de luciferasa se expresan como un porcentaje de las actividades de luciferasa inducidas por IFN α 2 3 nM.

55 Figura 4: Actividad de las construcciones purificadas dirigidas al mLR: A. Cuantificación de sus actividades específicas en células que expresan el objetivo (HL116-mLR) o en células que carecen del objetivo (HL116). B. Cálculo de las eficiencias de direccionamiento de las diferentes construcciones.

Figura 5: Actividad de la construcción 4-11-IFN α 2-R149A en presencia y ausencia del receptor de leptina no conjugada de unión al nanocuerpo. Las células HL116 que expresan el mLR se incubaron durante 6 horas con el
60 IFN- α 2 (IFN α 2) o el IFN α 2-R149A fusionados al nanocuerpo 4-11 (nanocuerpo-IFN α 2-R149A) en su respectiva

concentración de CE50 en presencia o ausencia (control) de un exceso molar de 100 veces del nanocuerpo libre 4-11.

Figura 6: Direccionamiento al IFN mutante usando el nanocuerpo de unión a leptina 4-10.

Figura 7: Actividad de luciferasa de luciérnaga inducida en células HL116 que expresan el mLR por el nanocuerpo IFN α 2R149A en presencia del anticuerpo monoclonal anti IFNAR1 64G12 (Benoit y col. J. Immunol. 150, 707-716. 1993) o anticuerpo monoclonal anti-IFNAR2 MMHAR2 (fuente de interferón PBL)

Figura 8: Especificidad del direccionamiento a de 4-11-IFNA2-R149A a células que expresan el mLR. A: Efecto citopático del EMCV en células HL116 (símbolos de color gris oscuro) o en HL116-mLR (símbolos de color gris claro) de IFNA2 parental (panel superior izquierdo) o de 4-11-IFNA2-R149A (panel inferior izquierdo). B: Panel superior: CE50 calculada para la actividad antiviral; panel inferior: eficiencias de direccionamiento calculadas Figura 9: Actividades específicas (CE50) de IFN α 2 (panel A) y el nanocuerpo-IFN α 2R149A (2R5A; panel B) en líneas celulares BXP3 y BT474 que expresan diferentes números de molécula de Her2 en su superficie ($10,9 \times 10^3$ y 478×10^3 , respectivamente). La escala de ordenadas del panel A no puede compararse con la escala de ordenadas del panel B. Figura 10: Direccionamiento del 1 R59B-IFNA2-Q124R a células de ratón que expresan Her2 humano. Cuantificación de la expresión del ARNm de OASL2 en células BTG9A con y sin expresión de Her2.

Figura 11: Direccionamiento de IFNA2 mutante a células de ratón que expresan Her2 humano, usando un anticuerpo de cadena única. Cuantificación de la expresión del ARNm de ISG15 en células BTG9A con y sin expresión de Her2.

Figura 12: Control de la activación de la fosforilación de Her2: calle 1 3 a 76: Her2 no fosforilado en extracto de células BTG9A que expresan Her2 humano tratado con diferente concentración (200 pM para la calle 3 a 5,2 nM para la calle 6) y tiempo (calle 3:5 min, calle 4 y 6:10 min, calle 5:30 min) con la construcción 1 R59B-IFNA2-Q124R. Calles 7 y 8: Control para la detección de Her2 fosforilado en la línea celular BT474 humana.

Calle 1: extracto de células BTG9A. Calle 2: extracto de células BTG9A que expresan Her2 humano.

Figura 13: Direccionamiento del anti PD-L2 122-1 FNA2-Q124R a células primarias de ratón que expresan endógenamente PD-L2. La activación se mide como fosforilación de STAT. El área gris clara representa la población de células negativas para PD-L2; el área gris oscura representa la población positiva para PD-L2.

Figura 14: Direccionamiento in vivo de 122-1 FNA2-Q124R a células que expresan PD-L2. A los ratones se les inyectó intraperitonealmente (IP) o intravenosa (IV) con PBS, una construcción de control (nanocuerpo contra GFP fusionado a mutante IFNA2-Q124R, indicado como control) o un IFN mutante dirigido (dirigido a PD-L2, NM22-IFN2-Q124R, indicado como 122-Q124R). El área gris clara representa la población de células negativas para PD-L2; el área gris oscura representa la población positiva para PD-L2.

Figura 15: Curva de respuesta a la dosis después de la inyección IV de 122-IFN-Q124R en ratones. El área gris clara representa la población de células negativas para PD-L2; el área gris oscura representa la población positiva para PD-L2.

Figura 16: Crecimiento dependiente de leptina inducido por la leptina mutante dirigida: la pérdida en la actividad de una leptina mutante puede rescatarse en células Ba/F3 que expresan el TNFR1 humano. Paneles superiores: Experimento usando la construcción de leptina-H6; panel inferior, experimento usando la construcción mleptina. H6 indica la etiqueta his (6 xhis).

Figura 17: Construcción de las construcciones de leptina dirigidas

40 EJEMPLOS

Materiales y procedimientos para los ejemplos

Nanocuerpos y ScFv

El nanocuerpo 4-11 dirigido contra el receptor de leptina murino se describió en Zabeau y col. (2012), y en la patente WO 2006/053883. Su secuencia codificante se clona en el vector de expresión de mamíferos pMET7 (Takebe y col., 1988) en fusión con el péptido líder Slgk, la etiqueta HA y la albúmina. Nombre del plásmido: pMET7 SlgK-HA-4.11-albúmina.

El nanocuerpo 4-10 también se describe en Zabeau y col. (2012).

Los nanocuerpos anti Her2 1R59B y 2R5A se describen en Vaneycken y col. (2011). Se fusionaron con el IFNA2-Q124R humano y con el IFNA2-R149A humano en el vector pMET7. La proteína de fusión se produjo por transfección de células 293T.

El nanocuerpo anti PD-L2 122 era de Johan Grooten (VI B). Se fusionó con el IFNA2-Q124R humano en el vector pMET7. La proteína de fusión se produjo por transfección de células 293T y se purificó usando el kit de purificación HisPur Ni-NTA (Pierce, Thermo Scientific).

El nanocuerpo anti TNF se obtuvo de Claude Libert (VIB).

El anti Her2 ScFv se obtuvo de Andrea Pluckthun (Wörn y col., 1998). Se fusionó con el IFNA2-Q124R humano en el vector pMET7. La proteína de fusión se produjo por transfección de células 293T.

El nanocuerpo de control contra GFP se obtuvo de Katrien Van Impe (Universidad de Gante)

Interferones

El IFN α 2 y los mutantes L153A y R149A que muestran una afinidad de IFNAR2 reducida por un factor 10 y 100, respectivamente, se han descrito en Roisman y col., (2001). Las secuencias codificantes de IFN se clonan en el vector pT3T7 (Stratagene) en fusión con la etiqueta ybbR. Nombres de plásmidos: pT7T3ybbR-IFN α 2, pT7T3ybbR-IFN α 2-L153A, pT7T3ybbR-IFN α 2-R149A.

El IFNA2 Q124R humano tiene una alta afinidad por la cadena IFNAR1 murina y una baja afinidad por la cadena IFNAR2 murina. (Weber y col., 1987)

10 Construcción de fusión de nanocuerpo-IFN.

La secuencia de codificación de la IFN α 2, de tipo silvestre, L153A y R149A se sintetizaron mediante PCR a partir de los correspondientes plásmidos pT3T7ybbR IFN α 2 usando el sistema de PCR de alta fidelidad Expand de Roche Diagnostics y los siguientes cebadores: Directos:

15 5'GGGGGGTCCGGACCATCACCATCACCATCACCATCACCATCACCCTGCTTCTCCCGCCTCCCCAGCATCACCTGCCAGCCCAGCAAGTGATAGCCTGGAATTTATTGC3' , inversos: 5' CGTCTAGATCATTCTTACTTCTTAAA C3 '. Esta PCR introduce una etiqueta His y una serie de 5 repeticiones de Prolina-Alanina-Serina (PAS) en el extremo amino terminal de los IFN. Los productos de la PCR se digirieron con BspEI y XbaI y se clonaron en el vector pMET7 SlgK-HA-4.11-albúmina digerido con BspEI-XbaI para obtener pMET7 SlgK-HA-4.11-His-PAS-ybbr-IFNA2, pMET7 SlgK-HA-4.11-His -PAS-ybbr-IFNA2-L153A y pMET7 SlgK-HA-4.11-His-PAS-ybbr-IFNA2-R149A.

20 De manera similar, el mutante humano Q124R se fusionó con el nanocuerpo 1 R59B y con el nanocuerpo anti-PD-L2.

Producción de la proteína de fusión de nanocuerpo-IFN

25 Las células HEK293T se cultivaron en DMEM complementado con SFB al 10 %. Éstas fueron transfectadas con pMET7 SlgK-HA-4.11-His-PAS-ybbr-IFNA2, pMET7 SlgK-HA-4.11-His-PAS-yNAbr-IFNA2-L153A pMET7 SlgK-HA-4.11-His-PAS-ybbr-IFNA2- R149A, pMET7 SlgK-HA-2R5A-His-PAS-ybbr-IFNA2-R149A, pMET7 SlgK-HA-1R59B-His-PAS-ybbr-IFNA2-Q124R, pMET7 SlgK-HA-4D5-His-PAS-ybbr-IF2 -Q124R o pMET7 SlgK-HA-122-His-PAS-ybbr-IFNA2-Q124R usando lipofectamina (Invitrogen). 48 horas después de la transfección, los medios de cultivo se recogieron y se almacenaron a -20 °C.

30 Como alternativa, las secuencias que codifican las diferentes fusiones de nanocuerpo-IFN se subclonaron en el plásmido de transferencia de baculovirus pBAC-3 (Novagen). Las proteínas se produjeron mediante células de insecto usando el kit BacVector (Novagen) y se purificaron hasta homogeneidad usando el kit de purificación HisPur Ni-NTA (Pierce, Thermo Scientific) y la filtración en gel. Las concentraciones de proteína se midieron por absorbancia a 280 nm.

Líneas celulares indicadoras IFN

40 El clon HL116 (Uzé y col. 1994) se deriva de la línea celular humana HT1080. Contiene el gen de luciferasa de luciérnaga controlado por el promotor 6-16 inducible por IFN. Las células HL116 se cotransfectaron con un vector de expresión que codifica la isoforma corta del receptor de leptina murina (pMET7 mLRsh-FLAG, Eyckerman y col., 1999) y pSV2neo (Southern y Berg 1982). Se aislaron clones transfectados estables en un medio que contenía G418. El clon 10 se seleccionó después del análisis del nivel de expresión en la superficie del receptor de leptina murino mediante FACS, usando el anticuerpo BAF497 del antireceptor de leptina de ratón biotinilado de R&D y estreptavidina-APC (BD bioscience)

45 Las células HT1080 se cotransfectaron con p6-16 RL, un plásmido que codifica la luciferasa de Renilla (de pRL-null, Promega) controlada por el promotor 6-16 inducible por IFN (de p1.8gpt-5, Pellegrini y col. 1989), pBB3 (Bourachot y col. 1982) y ADN de esperma de salmón (Sigma). Se aislaron clones transfectados estables en un medio que contenía HAT. El clon 4 se seleccionó para un alto nivel de inducción de la actividad de luciferasa de renilla tras la inducción de IFN.

50 Las líneas celulares de carcinoma pancreático humano BXPC3 (Tan y col., 1986; ATCC:CRL 1687) y cáncer de mama BT474 (Lasfargues y col., 1979; ATCC:HTB-20) se obtuvieron de ATCC. Las células BTG9A de ratón se describieron en Uzé y col. (1990).

55 Medición de las actividades de luciferasa

Las actividades específicas de IFN se midieron cuantificando la actividad luciferasa inducida en células HL116 y en el clon 10 de HL116 que expresa el mLR. Las CE50 se calcularon usando regresión de datos no lineales con el software GraphPad Prism.

60

Las actividades de la luciferasa se determinaron en un luminómetro Berthold centra LB960 usando el sistema de ensayo de luciferasa de luciérnaga o el sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual de Promega después de 6 h de estimulación con IFN.

5 **RT-PCR cuantitativa**

La expresión del gen inducible por interferón 6-16 se cuantificó mediante RT-PCR en relación con GAPDH o β -actina. Las células se trataron con IFN dirigido o de control durante 4 h. El ARN total se purificó con columnas RNeasy (Qiagen). Las transcripciones inversas se prepararon con cebadores aleatorios y se realizaron con el uso de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (Invitrogen). La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó usando un variador de luz como se describe (Coccia y col. 2004).

Para Her2, el medio de cultivo de transfección se analizó en células BTG9A y BTG9A murinas que expresan Her2 humano para la expresión del gen OASL2 en relación con la expresión del gen de la actina β por RT-PCR cuantitativa usando un variador de luz (Roche) y los siguientes cebadores: OASL2 directo: CAC-GAC-TGT-AGG-CCC-CAG-CGA; OASL2 inverso: AGC-AGC-TGT-CTC-TCC-CCT-CCG; β actina directa: AGA-GGG-AAA-TCG-TGC-GTG-AC; β actina inversa: CAA-TAG-TGA-TGA-CCT-GGC-CGT. De manera similar, la expresión de ISG en células dirigidas a Her2 se midió usando los mismos cebadores de β actina y los siguientes cebadores de ISG15: ISG15 directo: GAG-CTA-GAG-CCT-GCA-GCA-AT; ISG15 inverso: TTC-TGG-GCA-ATC-TGC-TTC-TT.

20 **Ensayo Antiviral**

El ensayo antiviral se realizó usando el virus EMC y puntuando el efecto citopático dependiente de la replicación del virus como se describe en Stewart (1979)

25 **Medición de la fosforilación de Her2**

Las células BTG9A que expresan Her2 humano se trataron con 200 pM a 2 nM de 1 R59B-IFNA2-Q124R durante 10 a 30 minutos. Las células se lisaron en RIPA y se analizaron mediante transferencia de Western en un Odyssey Fc (Licor Bioscience) después de SDS-PAGE al 7% (40 μ g de calle). Se detectó Fosfo-Her2 con el anti Her2 YP 1248 (Upstate # 06-229) y el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IRDye 680 (Licor Bioscience # 926-32221).

Medición de la fosforilación de STAT1

STAT1 fosforilado en Y701 fue detectado por FACS usando STAT1 -PY701 (PE) (Beckton Dickinson # 612564) y las instrucciones del fabricante para la tecnología PhosFlow.

Construcciones de leptina dirigida

La secuencia de las construcciones de leptina dirigidas se proporciona en la Figura 17. El L86 que se indica es el aminoácido que se muta a S o N.

Ejemplo 1: Las proteínas de fusión nanocuerpo-interferón.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de las proteínas de fusión nanocuerpo-IFN construidas con IFN α 2 de tipo silvestre o con los mutantes L153A y R149A.

Ejemplo 2: La actividad de IFN de las proteínas de fusión nanocuerpo-IFN se dirige hacia las células que expresan el receptor de leptina murina (solo para ilustración)

Las proteínas de fusión de tres nanocuerpos con IFN α 2 WT, IFN α 2 L153A o R149A se analizaron en células HL116 y HL116-mLR-clon 10 que expresan el receptor de leptina murino. El IFN α 2 solo también se analizó en este sistema de ensayo con el fin de verificar que los dos clones celulares no difieran en su capacidad de respuesta al IFN. De hecho, tanto las células HL116 como HL116-mLR-clon 10 son igualmente sensibles a este IFN (Figura 2A y 2C, símbolos negros). Sin embargo, la actividad de IFN de las proteínas de fusión de tres nanocuerpos-IFN aumenta drásticamente en las células que expresan el receptor de leptina en comparación con las células HL116 parentales (compárese la Figura 2A con la Figura 2C y la Figura 2B con la Figura 2D).

Los investigadores estimaron que las células que expresan el receptor de leptina son 10, 100 y 1000 veces más sensibles que las células HL116 parentales al nanocuerpo-IFN WT, L153A y R149A, respectivamente. Dado que las afinidades por IFNAR2 del mutante IFN L153A y R149A son 0,1 y 0,01 en relación con el WT, existe una correlación

entre la pérdida de actividad causada por mutaciones en el sitio de unión de IFNAR2 y la eficiencia del direccionamiento por parte del nanocuerpo.

5 Con el fin de determinar si la actividad de IFN de las proteínas de fusión nanocuerpo-IFN se administra solo en células que expresan el objetivo del nanocuerpo o también en células vecinas, el nanocuerpo-IFN α 2R149A se analizó en un cocultivo de HL116-mLR-clon10 y HT1080-6-16 renilla luciferasa clon4. Ambos tipos de células expresarán actividad de luciferasa en respuesta a la estimulación por IFN pero las células que expresan el objetivo del nanocuerpo mostrarán una actividad de luciferasa de luciérnaga mientras que las células desprovistas de receptor de leptina mostrarán una actividad de luciferasa de renilla. La dilución de la proteína nanocuerpo-10 IFN α 2R149A se eligió a 1/30, una dilución que induce una respuesta máxima en células que llevan el receptor de leptina y una respuesta mínima en células desprovistas del objetivo del nanocuerpo (véase la Figura 2B y D, curvas negras) . La Figura 3 muestra claramente que la actividad de luciferasa de renilla no se induce tras la estimulación del co-cultivo con el nanocuerpo-IFN α 2R149A, lo que indica que la actividad de IFN dirigida se administra solo en las células que expresan el antígeno reconocido por el nanocuerpo.

15 La eficacia del direccionamiento se ilustra adicionalmente comparando la actividad de tipo silvestre y dos tipos de IFN mutante (L153A y R149A) cuando se añade a HL116 que expresa o no el receptor de leptina murino que se usa para el direccionamiento. Los resultados muestran claramente que la actividad de los mutantes es mayor cuando se dirige la construcción, y que el efecto del direccionamiento para el mutante es mayor que para el tipo silvestre. 20 (Figura 4A y B)

Con el fin de demostrar que el direccionamiento era específico de nanocuerpo, las células HL116 que expresaban el mLR se incubaron durante 6 horas con el IFN- α 2 (indicado como IFNA2) o el IFNA2-R149A fusionado con el nanocuerpo 4-11 (nanocuerpo-IFNA2-R149A) a su respectiva concentración de CE50 en presencia o ausencia 25 (control) de un exceso molar de 100 veces de nanocuerpo 4-11 libre. Las células se lisaron y se midieron las actividades de luciferasa inducidas por IFN. Como se muestra en la Figura 5, el IFN no dirigido no está inhibido por el nanocuerpo libre, mientras que la construcción dirigida está fuertemente inhibida, lo que muestra el efecto específico del direccionamiento.

30 El direccionamiento al receptor de leptina es independiente del epítipo en el receptor: usando el nanocuerpo antireceptor de leptina 4-10 (Zabeau y col., 2012) que reconoce un dominio diferente en el receptor que el nanocuerpo 4-11, una activación similar se puede obtener usando un IFN mutante dirigido (Figura 6).

Ejemplo 3: La actividad de IFN de las proteínas de fusión nanocuerpo-IFN en células que expresan el receptor de leptina está mediada por ambas cadenas de receptores de IFN (solo para ilustración) 35

Con el fin de determinar si la actividad de IFN de las proteínas de fusión nanocuerpo-IFN necesita la activación del receptor de IFN, las células HL116 que expresan el receptor de leptina murina se trataron previamente con anticuerpos neutralizantes contra IFNAR1 o IFNAR2, y luego se estimularon con la proteína de fusión nanocuerpo-40 IFNA2-R149A. Se midió la actividad de la luciferasa inducida por IFN. La Figura 7 muestra que tanto los anticuerpos neutralizantes anti IFNAR1 como anti-IFNAR2 inhiben la actividad IFN del nanocuerpo-IFNA2-R149A.

Ejemplo 4: Inducción específica de la diana de la actividad antiviral por 4-11-IFNA2-R149A en células que expresan el receptor de leptina murino (solo para ilustración) 45

La actividad antiviral es una parte integrada de la respuesta de IFN, que implica la expresión de varios genes. Por lo tanto, la actividad antiviral en la célula que expresaba mLR se controló, después de dirigirse al mutante R149A IFN usando el anticuerpo antireceptor de leptina 4-11. Los resultados se resumen en la Figura 8. La actividad se midió como el efecto citopático en las células HL116, con o sin expresión del receptor de leptina. La actividad antiviral 50 específica de la proteína de fusión nanocuerpo-IFN 4-11-IFNA2-R149A es 716 veces mayor cuando se analiza en células que expresan el receptor de leptina en comparación con las células HL116.

Ejemplo 5: Direccionamiento de la actividad de IFN en células que expresan Her2

55 Con el fin de demostrar que el concepto no está restringido al direccionamiento del receptor de citocinas, los investigadores generaron una proteína de fusión similar usando el nanocuerpo 2R5A contra Her2 (Vaneycken y col., 2011) y el mutante IFN alfa2 R149A (2R5A-IFNA2-R149A). Esta molécula se analizó en líneas celulares BXPC3 (cáncer pancreático, de ATCC) y BT474 (cáncer de mama, de ATCC) y se comparó con la actividad de IFN- α 2 (IFNA2) para la inducción del gen inducible por IFN 6-16 según se determinó en relación con GAPDH por RT-PCR 60 cuantitativa. Las líneas celulares BXPC3 y BT474 se diferencian en el número de moléculas Her2 expresadas en su

superficie ($10,9 \times 10^3$ y 478×10^3 , respectivamente, según lo indicado por Gaborit y col. (2011)). La Figura 9 muestra la determinación de la EC_{50} de la actividad de IFNA2 (panel A) y la actividad de 2R5A-IFNA2-R149A (panel B) para la inducción del gen 6-16 inducible por IFN en líneas celulares BXPC3 y BT474. El panel A muestra que las líneas celulares BXPC3 y BT474 muestran la misma sensibilidad a IFN- $\alpha 2$. El panel B muestra que la proteína de fusión nanocuerpo-IFN 2R5A-IFNA2-R149A es mucho más potente en la línea celular BT474 que expresa 40 veces más molécula de Her2 que BXPC3.

En conclusión, el concepto que consiste en dirigir la actividad de IFN de tipo I en células que expresan un antígeno específico de la superficie celular, como se muestra en las células humanas que expresan el receptor de leptina de ratón, puede extenderse a células humanas no transfectadas que expresan otra molécula de superficie celular de una familia estructural diferente, a un nivel naturalmente encontrado en varios tipos de carcinoma de mama.

Ejemplo 6: Direccionamiento del mutante IFNA2-Q149R a células de ratón que expresan Her2 humano

El mutante IFNA2 Q149R humano se dirigió a células murinas, que expresan el Her2 humano, usando el nanocuerpo 1 R59B en el 1 R59B-IFNA2-Q124R. La IFNA2-Q124R tiene una alta afinidad con la cadena IFNAR1 murina y una baja afinidad con la cadena IFNAR2 murina (Weber y col., 1987). La inducción por IFN se midió como expresión del ARN mensajero OASL2, por RT-QPCR. Los resultados se muestran en la Figura 10. Existe claramente una inducción específica del direccionamiento en las células que expresan Her2, mientras que no se detecta ninguna expresión significativa en las células BTG9A no transfectadas.

Se obtuvieron resultados similares cuando se usó el ScFv específico de Her2 contra Her2 para dirigir al mutante IFN Q124R. En este caso, la inducción de IFN se midió usando la expresión de ARN mensajero ISG15. Los resultados se muestran en la Figura 11. Nuevamente, se observa una inducción específica de ISG15 en las células que expresan Her2, mientras que hay poco efecto del IFN mutante en las células que no expresan Her2.

Ejemplo 7: La construcción 1 R59B-IFNA2-Q124R no activa la fosforilación de Her2

Para verificar si el direccionamiento de Her2 tiene como resultado una activación de Her2, la fosforilación de Her2 se controló en las células dirigidas. Los resultados se muestran en la Figura 12, lo que demuestra claramente que no se pudo detectar Her2 fosforilado en células dirigidas a 1 R59B-IFNA2-Q124R, independientemente de la concentración o el momento del tratamiento.

Ejemplo 8: La actividad de la construcción anti PD-L2 Nb122-IFNA2-Q124R se dirige a las células primarias de ratón que expresan PD-L2

Se aislaron células de una cavidad peritoneal de ratón y se trataron in vitro con Nb122-IFNA2-Q124R o mIFNa/ β natural durante 30 minutos. Las células se fijaron, se permeabilizaron, se marcaron con anticuerpos contra PD-L2 (APC) (BD # 560086) y STAT1-PY701 (PE) (BD # 612564) y se analizaron mediante FACS.

La población celular positiva para PD-L2 representa el 20 % de la población celular total presente en la cavidad peritoneal del ratón.

Los resultados se muestran en la Figura 13. De esta figura se desprende que en células no tratadas, o en células tratadas con IFN murino no dirigidas, los picos de STAT1-P para las células que expresan PD-L2 y no expresan coinciden. Además, se puede ver una clara inducción de STAT1-P mediante el tratamiento con IFN murino. El tratamiento con el IFN mutante dirigido, sin embargo, da como resultado un cambio específico en el STAT1-P solo para las células que expresan PD-L2.

Se obtiene el mismo resultado si la respuesta de IFN de los esplenocitos se analiza en un experimento similar. La población celular positiva para PD-L2 representa el 1 % de la población celular total presente en el bazo del ratón, lo que indica que también una población celular menor puede ser dirigida de manera eficiente.

Ejemplo 9: La inyección in vivo de la construcción 122-IFNA2-Q124R induce una respuesta de IFN solo en células que expresan PD-L2

Los ratones se inyectaron (IP o IV) con PBS, Nb122-IFNA2-Q124R o un control Nb (contra GFP) fusionado a IFNA2-Q124R. 30 minutos después de la inyección, los ratones se sacrificaron, las células de la cavidad peritoneal se recuperaron lavando la cavidad peritoneal con PBS, fijadas (PhosLow Fix buffer I BD # 557870), permeabilizadas (PhosFlow Perm buffer III, BD # 558050), marcadas con Abs contra PD-L2 (APC) (BD # 560086) y STAT1 -PY701

(PE) (BD # 612564) y analizadas por FACS. Los resultados se muestran en la Figura 14. STAT1-P coincide en células positivas y negativas para PD-L2 tratadas con PBS o con anticuerpo de control. Sin embargo, se puede ver una clara inducción en STAT1-P (solo en la población de células positivas para PDL2) cuando se inyecta a los ratones el IFN mutante dirigido.

5

Como control, se comprobó STAT1-P en ratones, se inyectó iv con diferentes dosis de IFN natural de ratón (10 000, 100 000 o 1 000 000 unidades), y no se pudo detectar ninguna diferencia en STAT1-P entre las células positivas para PD-L2 y negativas para PD-L2.

10 La Figura 15 muestra una curva de respuesta a la dosis similar después de la inyección iv de la construcción Nb12N2-IFNA2-Q124R. Se puede notar un cambio en STAT1-P en las células que expresan PD-L2 incluso con la dosis más baja de 64 ng.

Ejemplo 10: Direccionamiento de la leptina mutante al receptor de leptina, usando un receptor de TNF α

15 **truncado (solo para ilustración)**

Las células Ba/F3 son dependientes del crecimiento de IL-3. Después de la transfección con el mLR, las células Ba/F3 también proliferan con la leptina. Los mutantes de leptina con afinidad reducida por su receptor son menos potentes para inducir y mantener la proliferación de células Ba/F3-mLR. La leptina mutante L86S tiene una moderada y la mutante L86N tiene una fuerte reducción en la afinidad y, por lo tanto, una capacidad reducida moderada y fuerte para inducir la proliferación, respectivamente.

20

La transfección adicional de células Ba/F3-mLR con el receptor 1 de TNF α humano (hTNFR1) que carece de su dominio intracelular introduce un receptor no funcional que puede funcionar como un marcador extracelular unido a la membrana.

25

Las proteínas quiméricas que consisten en leptina y un nanocuerpo contra TNFR1 humano (en este caso nb96) se unirán a las células que llevan el mLR y a las células que llevan el hTNFR1. Las proteínas quiméricas con leptina mutantes L86S y L86N han reducido la afinidad por el LR pero conservan su afinidad por el hTNFR1.

30

Las proteínas quiméricas se produjeron por transfección transitoria de células Hek293T con plásmidos de expresión. El sobrenadante fue de 0,45 μ m, se filtró y se diluyó en serie en placas de 96 pocillos para el ensayo. Se usó una dilución en serie de leptina recombinante purificada como referencia. Se sembraron en placa de 3000 a 10000 células por pocillo y se midió la proliferación mediante tinción con XTT cuatro o cinco días después. La DO se midió a 450 nm. Los resultados se muestran en la Figura 16, para dos experimentos que usan una construcción de leptina diferente (véase la Figura 17). Para ambas construcciones, se puede ver una estimulación del crecimiento dependiente de hTNFR para las construcciones mutantes, mientras que la expresión de hTNFR no afecta el crecimiento de las células tratadas con leptina wt (no dirigida). De estos resultados se desprende claramente que el direccionamiento puede compensar el efecto negativo de la mutación.

40

REFERENCIAS

- Benoit, P., Maguire, D., Plavec, I., Kocher, H., Tovey, M. y Meyer, F. (1993). *J. Immunol.*, 150,707 -716
- Bourachot, B., Jouanneau, J., Giri, I., Katinka, M., Cereghini, S., y Yaniv, M. (1982). *EMBO J.*, 1, 895-900.
- 45 • Brecht A., Gauglitz G., Polster J. (1993). *Biosens. Bioelectron.* .. 8, 387-392.
- Coccia, EM, Severa, M, Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, ME., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R. y Uzé, G. (2004). *Eur. J. Immunol.* 34. 796-805.
- Conklin, D. (2004). *J. Computational Biol.* 11, 1189-1200.
- Eyckerman, S., Waelput, W., Verhee, A., Broekaert, D., Vandekerckhove, J., y Tavernier, J. (1999). *Eur. Cytok. Netw.* 10, 549-559.
- 50 • Gaborit, N., Labouret, C, Vallaghe, J., Peyrusson, F., Bascoul-Mollevi, C.? Crapez, E., Azria, D., Chardès, T., Poul, MA, Mathis, G., Bazin, H., Pèleguin, A. (2011). *J. Biol. Chem.* 286, 11337-11345.
- Ortiz-Sanchez, E., Helguera, G., Daniels, TR y Penichet, ML (2008). *Expert Opin. Biol. Ther.*, 8, 609-632.
- Pellegrini, S., John, J., Shearer, M., Kerr, IM y Stark, GR (1989). *Mol. Cell. Biol.* 9, 4605-4012.
- 55 • Piehler, J., Roisman, LC y Schreiber, G. (2000). *J. Biol. Chem.* 275, 40425-40433.
- Lasfargues, EY, Coutino, WG y Dion, AS (1979). *In Vitro*, 15, 723-729..
- Roisman, LC, Piehler, J., Trosset, JY, Scheraga, HA y Schreiber, G. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. YSA*, 98, 13231-13236.

- Rossi, EA, Goldenberg, DM, Cardillo, TM, Stein, R. y Chang, CH (2009) Blood, 114, 3964-3871.
- Southern, PJ y Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341. Skerra, A. (2008). FEBS J., 275, 2677-2683.
- Stewart II WE The interferon system. Springer-Verlag, Wien, Nueva York. 1979.
- Takabe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokata, K. y Arai, N. (1988). Mol. Cell. Biol. 8, 466-472.
- 5 • Tan, MH, Nowak, NJ, Loor, R., Ochi, H., Sandberg, AA, López, C, Pickren, JW, Berjian, R., Douglass, HO jr. y Chu, TM (1986) Cancer Invest. 4, 15-23.
- Uzé y col. Cell 60, 225-234 (1990).
- Uzé, G., Di Marco, S., Mouchel-Veilh, E., Monneron, D., Bandu, MT, Horisberger, MA, Dorques, A., Lutfalla, G., y Mogensen, KE (1994). J. Mol. Biol. 243, 245-257.
- 10 • Vaneycken, I., Devoogdt, N., Van Gassen, N., Vincke, C, Xavier, C, Wernery, U., Muyltermans, S., Lahoutte, T. y Caveliers, V. (2011). FASEB J. 25, 2433-2446.
- Weber y col. (1987) EMBO J. 6, 591-598.
- Wörn y col., FEBS Lett. 427, 357-361 (1998)
- Zabeau, L., Verhee, A., Catteeuw, D., Faes, L., Seeuws, S., Decruy, T., Elewaut, D., Peelman, F. y Tavernier, J.
- 15 (2012). Biochem. J 441, 425-434.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW UNIVERSITEIT GENT CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITÉ
 20 MONTPELLIER 2 CENTRO HOSPITALIER UNIVERSITARIO REGIONAL DE MONTPELLIER UNIVERSITÄT
 OSNABRÜCK
 <120> CITOCINAS DE HAZ ALFA HELICOIDAL MUTANTES DIRIGIDAS
 <130> JT/TARG/403
 <150> Patente EP 12305075.9
 25 <151> 2012-01-20
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 108
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 1
 gggggggtccg gaccatcacc atcaccatca ccacccat caccctgctt ctcccgcctc 60
 35 cccagcatca cctgccagcc cagcaagtga tagcctggaa tttattgc 108
 <210> 2
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 cgtctagatc attccttact tcttaaac 28
 <210> 3
 45 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 3
 caccactgta ggccccagcg a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador
 <400> 4
 agcagctgtc tctcccctcc g 21
 <210> 5
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 5
 agagggaaat cgtgctgac 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 caatagtgat gacctggccg t 21
 20 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 7
 gagctagagc ctgcagcaat 20
 <210> 8
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 35 ttctgggcaa tctgcttct 20
 <210> 9
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Construcción de H6-leptina
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94) .. (94)
 45 <223> Xaa puede ser Ser o Asn
 <400> 9

ES 2 694 180 T3

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

ES 2 694 180 T3

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Thr Arg Thr Gly Phe Thr Ala Ser Thr Asn Ala Val
245 250 255

Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Cys Glu Trp Val Ser Tyr
260 265 270

Met Thr Ile Pro Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly
275 280 285

Arg Phe Ala Met Ser Arg Asp Lys Ala Lys Ser Thr Val Phe Leu Gln
290 295 300

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Asp
305 310 315 320

Val Pro Phe Ser Thr Leu Pro Ala Met Cys Thr Asn Asp Gly Pro Trp
325 330 335

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His
340 345 350

<210> 10

<211> 345

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción de Mleptina

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (88) .. (88)

<223> Xaa puede ser Ser o Asn

<400> 10

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

Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val
20 25 30

Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His
35 40 45

Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln
50 55 60

ES 2 694 180 T3

Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn
65 70 75 80

Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Xaa Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys
85 90 95

Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu
100 105 110

Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu
115 120 125

Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val
130 135 140

Ser Pro Glu Cys Ala Leu Asp Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
180 185 190

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Ser Ser Gly Ser Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
210 215 220

Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Arg
225 230 235 240

Thr Gly Phe Thr Ala Ser Thr Asn Ala Val Gly Trp Tyr Arg Gln Gly
245 250 255

Pro Gly Lys Lys Cys Glu Trp Val Ser Tyr Met Thr Ile Pro Ser Gly
260 265 270

Arg Thr Thr Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Ala Met Ser Arg
275 280 285

Asp Lys Ala Lys Ser Thr Val Phe Leu Gln Asn Ser Leu Lys Pro Glu
290 295 300

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Asp Val Pro Phe Ser Thr Leu Pro

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de direccionamiento, que comprende un interferón alfa 2 humano mutante acoplado a un resto de direccionamiento, donde el interferón alfa 2 mutante humano está mutado en uno o más aminoácidos de la región 144-154 y tiene una afinidad reducida por su receptor de interferón y un actividad biológica reducida de menos del 70 % de la actividad biológica del interferón de tipo silvestre, y donde el resto de direccionamiento comprende un dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH) dirigidos a Her2, DC-STAMP, PD-L2 o CD20.
5
- 10 2. La construcción de direccionamiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho interferón alfa 2 humano mutante se selecciona de entre el grupo que consiste en IFN α 2 L153A, IFN α 2 R149A e IFN α 2 M148A.
3. Una construcción de direccionamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como un medicamento.
15
4. La construcción de direccionamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer.
5. La construcción de direccionamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una enfermedad viral.
20
6. La construcción de direccionamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de enfermedades que comportan la degradación ósea.
- 25 7. Una composición farmacéutica, que comprende una construcción de direccionamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones, y un excipiente adecuado.
8. La construcción de direccionamiento de la reivindicación 1, donde el resto de direccionamiento se dirige al ligando programado de muerte 2 (PD-L2).
30
9. La construcción de direccionamiento de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
10. La construcción de direccionamiento de la reivindicación 1, donde el resto de direccionamiento se dirige a Her-2.
35
11. La construcción de direccionamiento de acuerdo con la reivindicación 10, donde el interferón humano mutante, alfa 2 comprende una mutación R149A.
- 40 12. La construcción de direccionamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, para su uso en el tratamiento del cáncer.

Figura 1

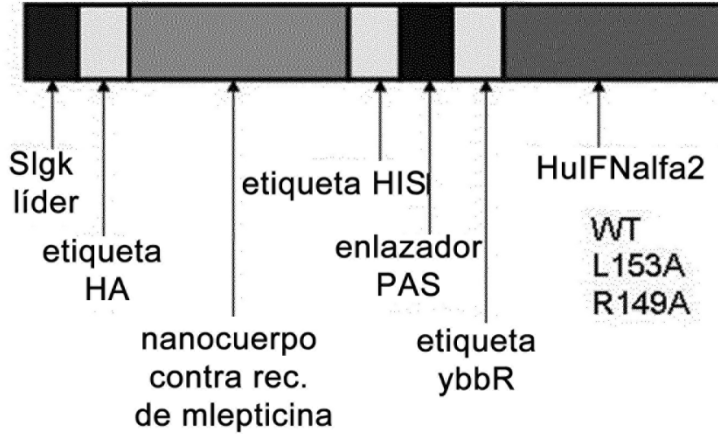


Figura 2

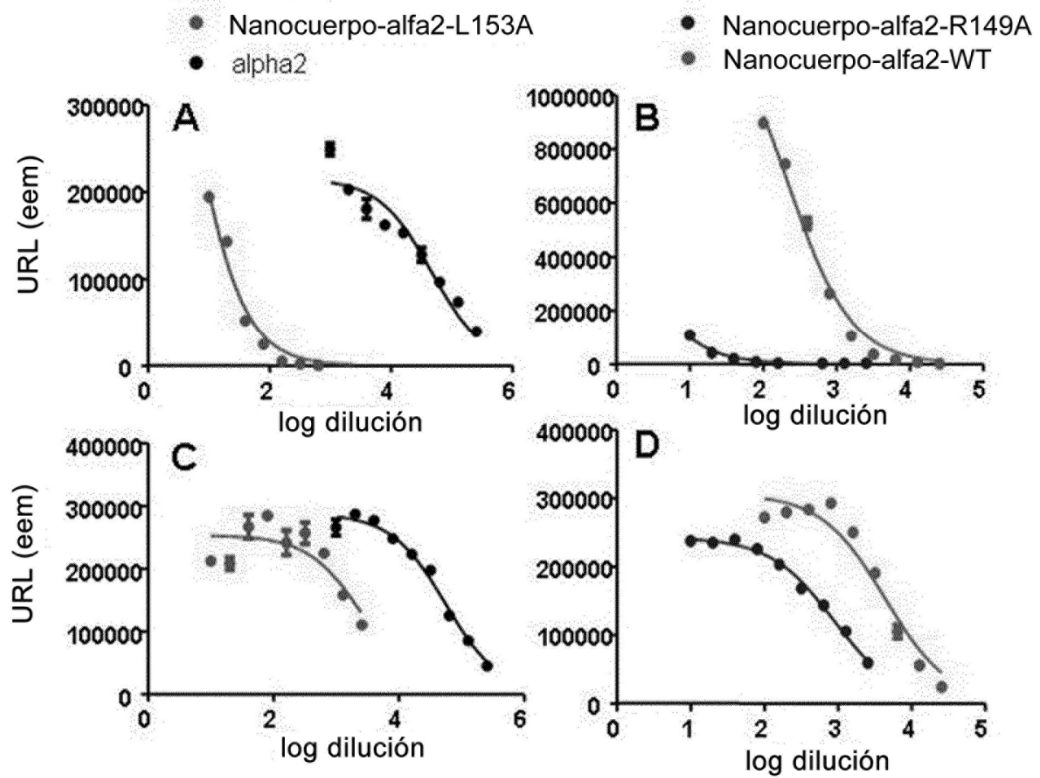


Figura 3

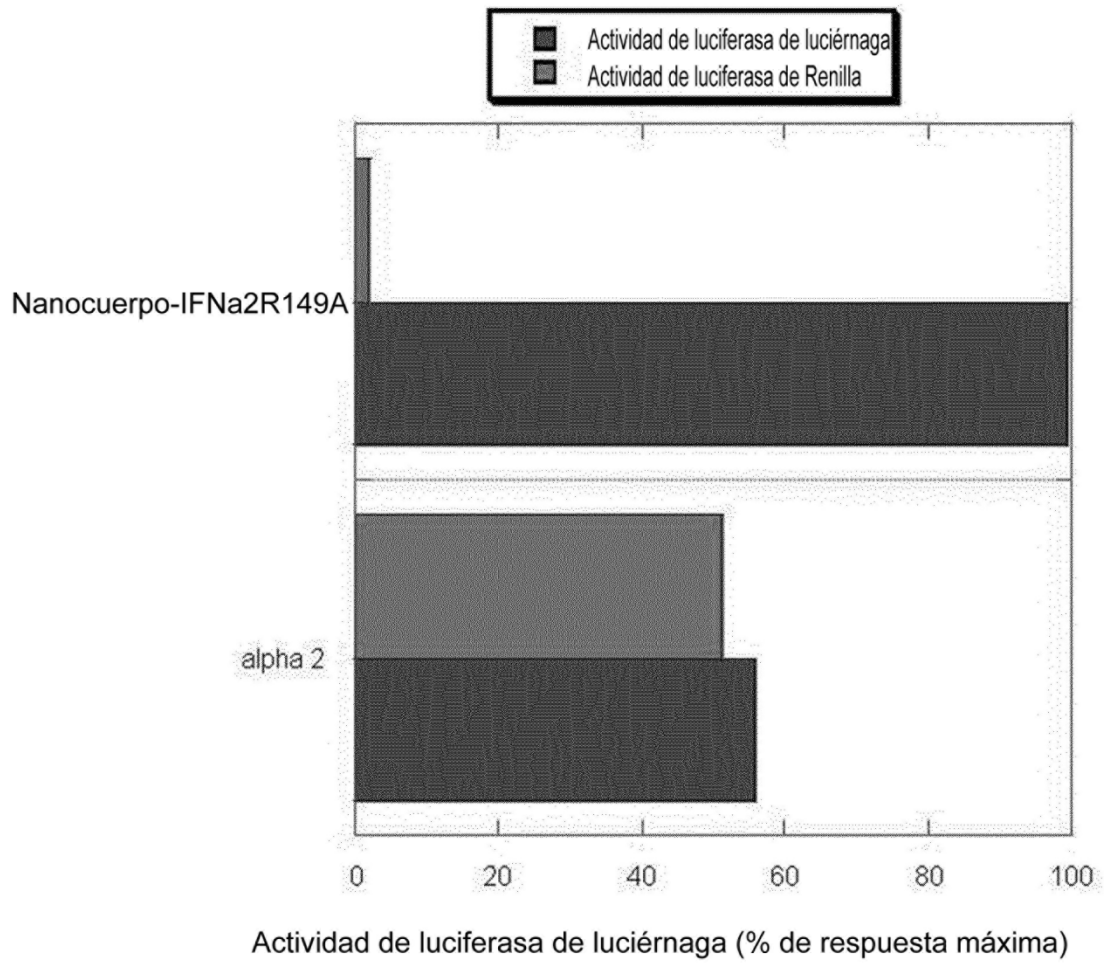
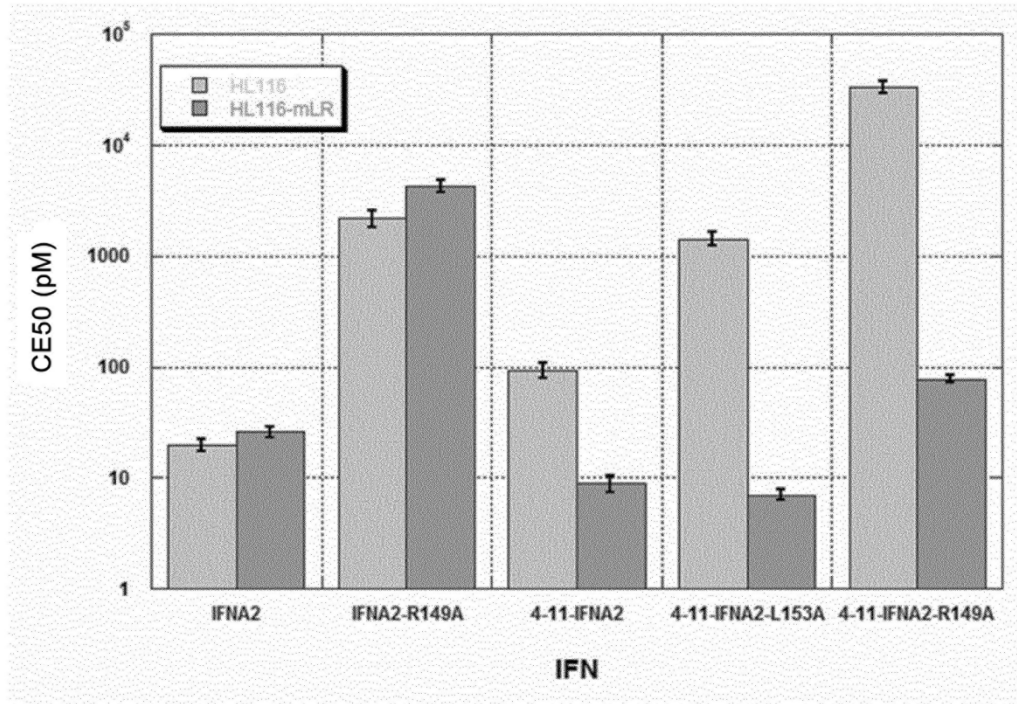


Figura 4

A



B

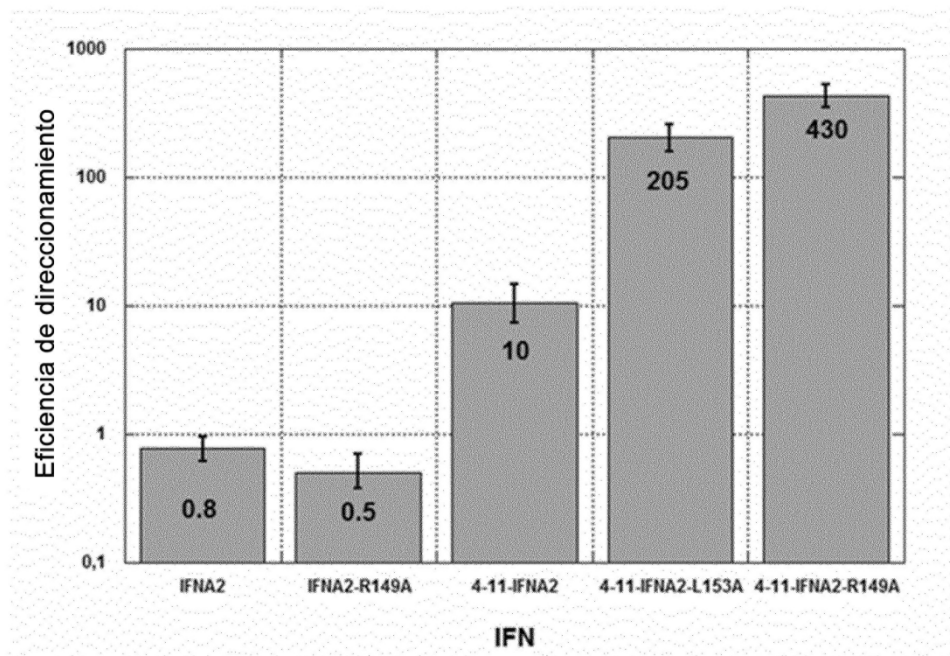


Figura 5

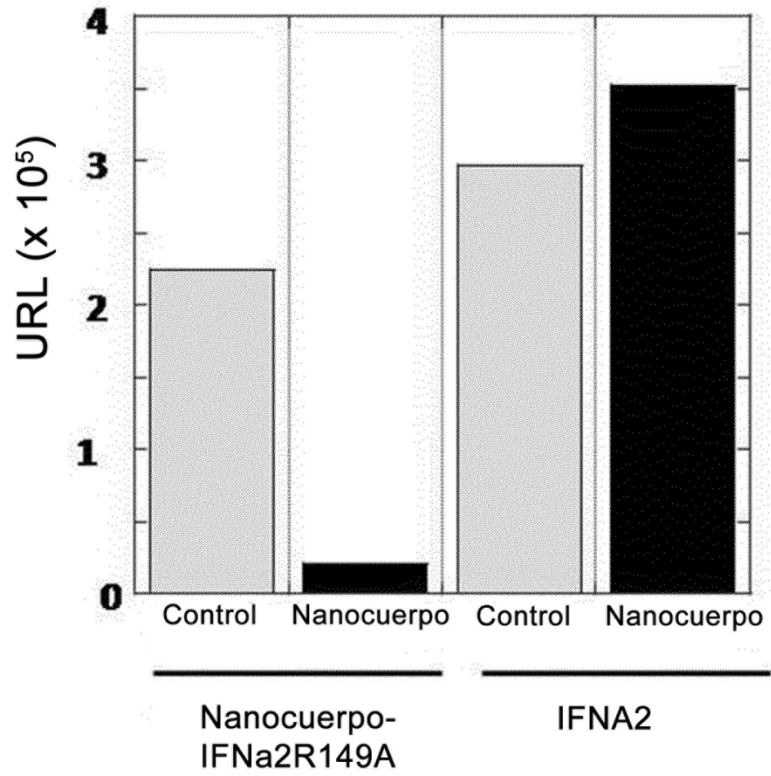


Figura 6

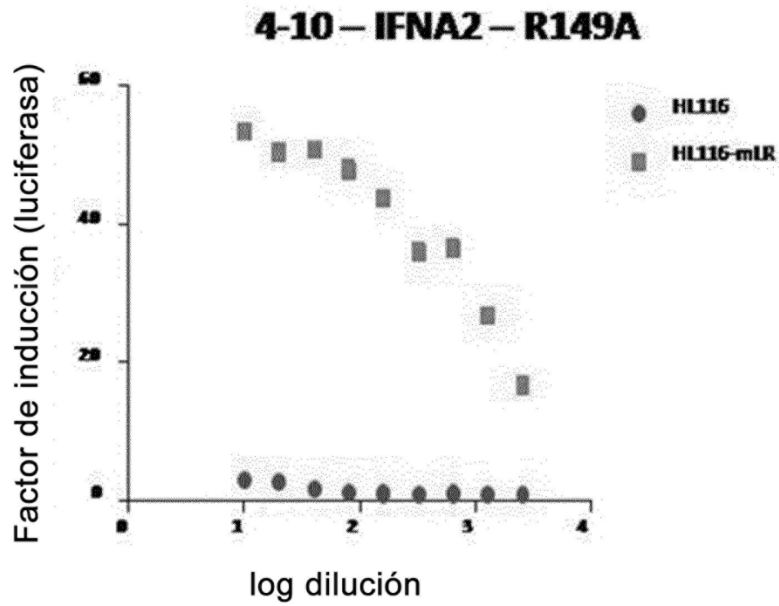


Figura 7

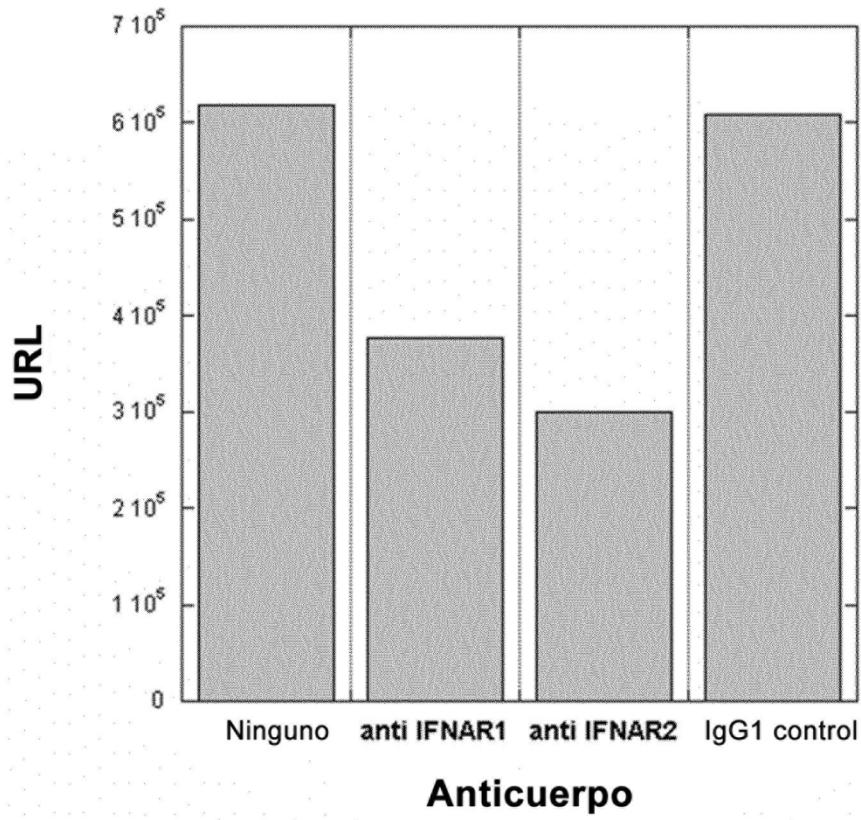


Figura 8

A

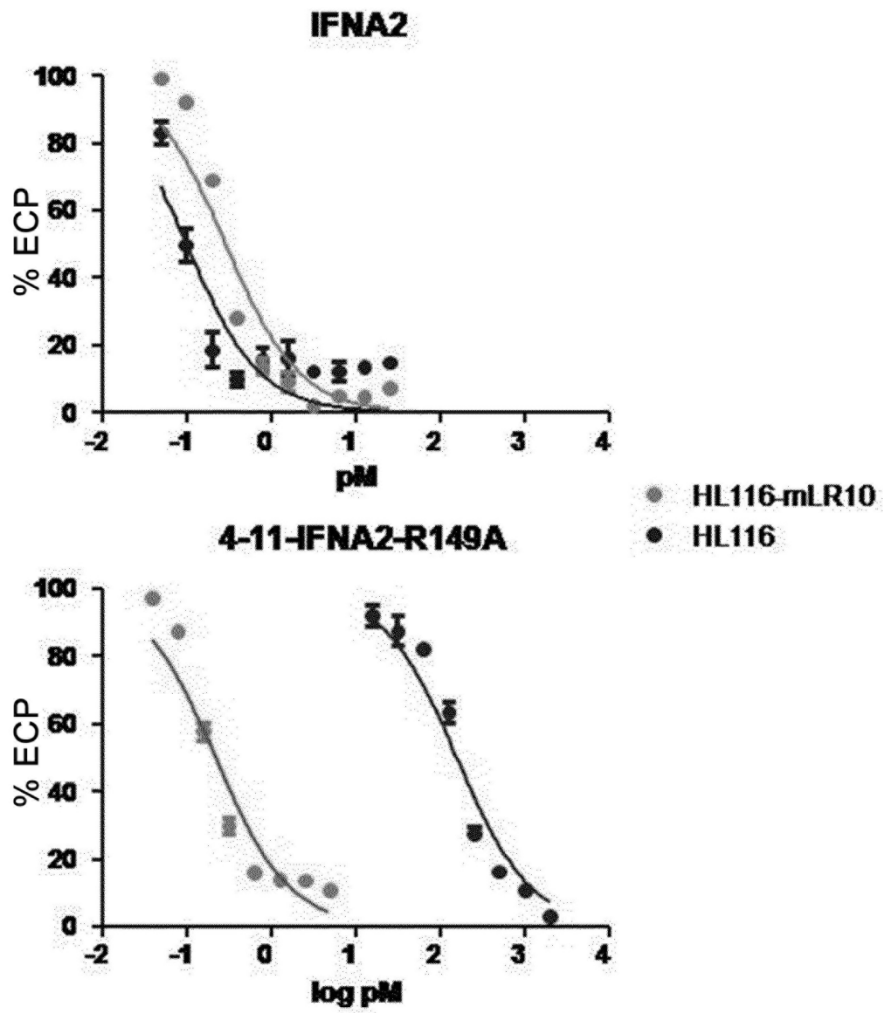


Figura 8 continuación

B

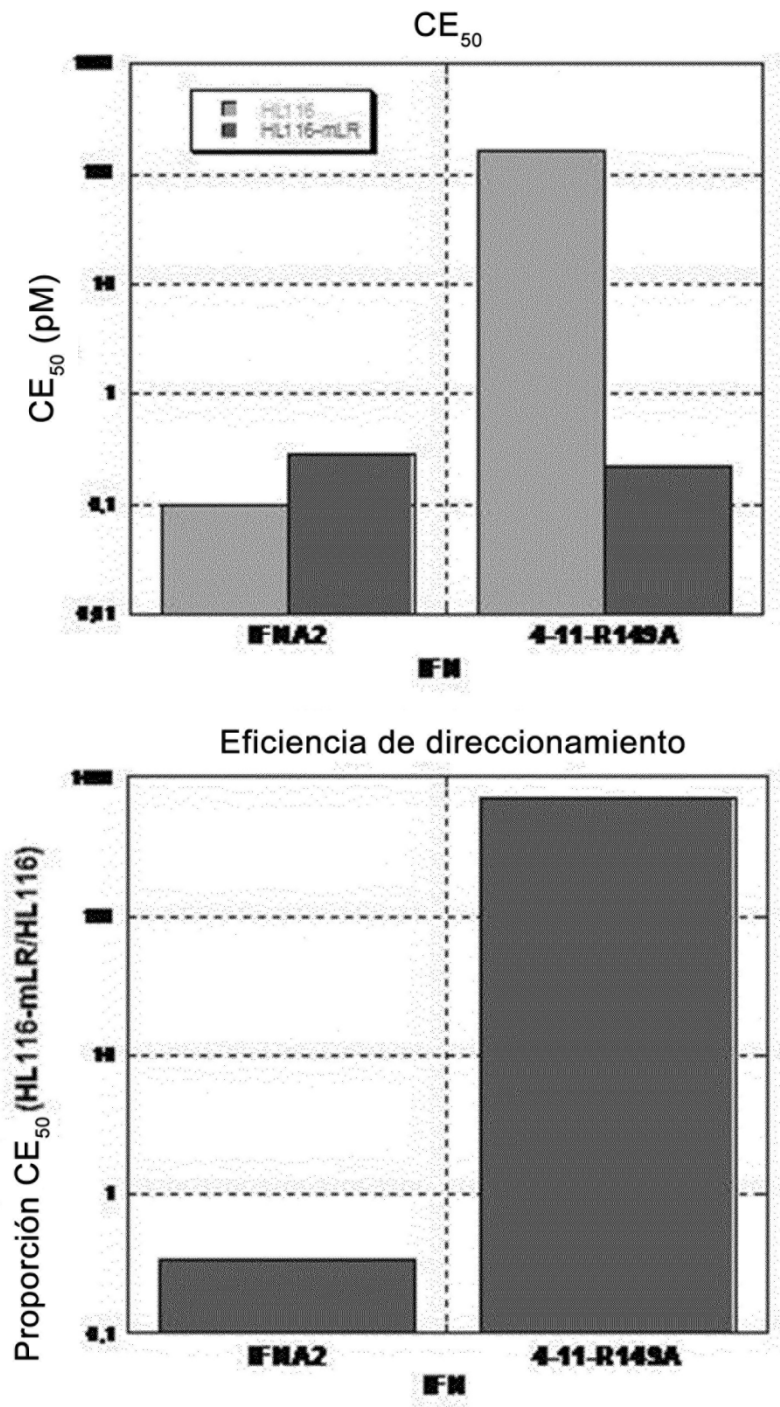
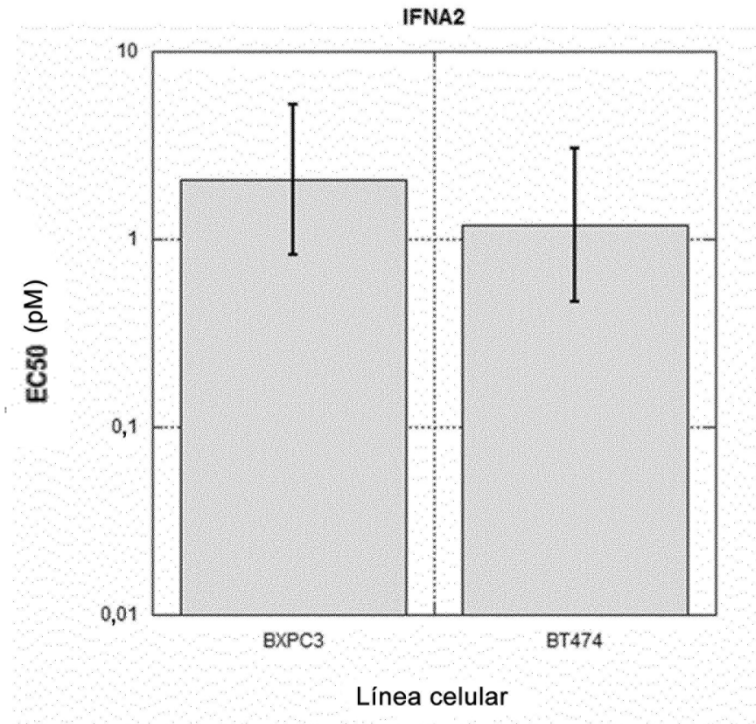


Figura 9

A



B

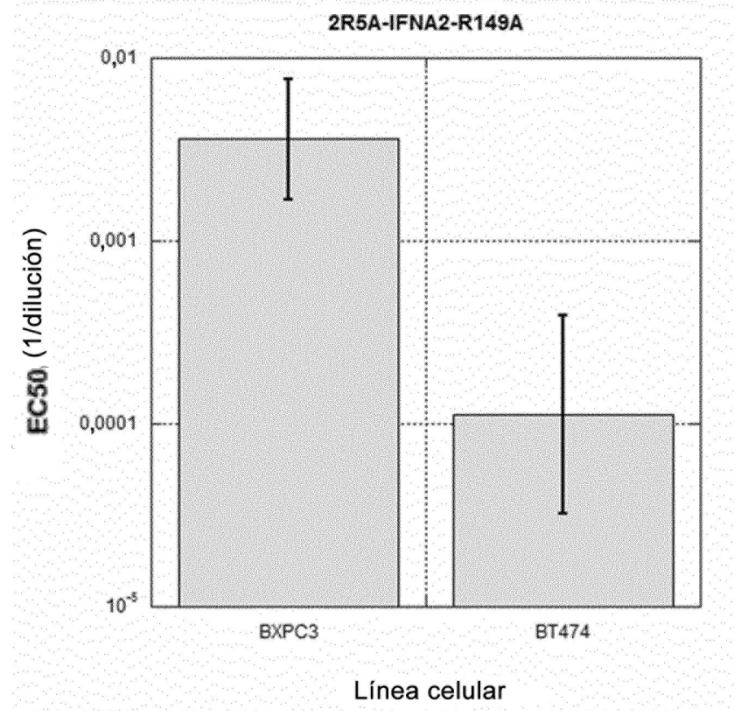


Figura 10

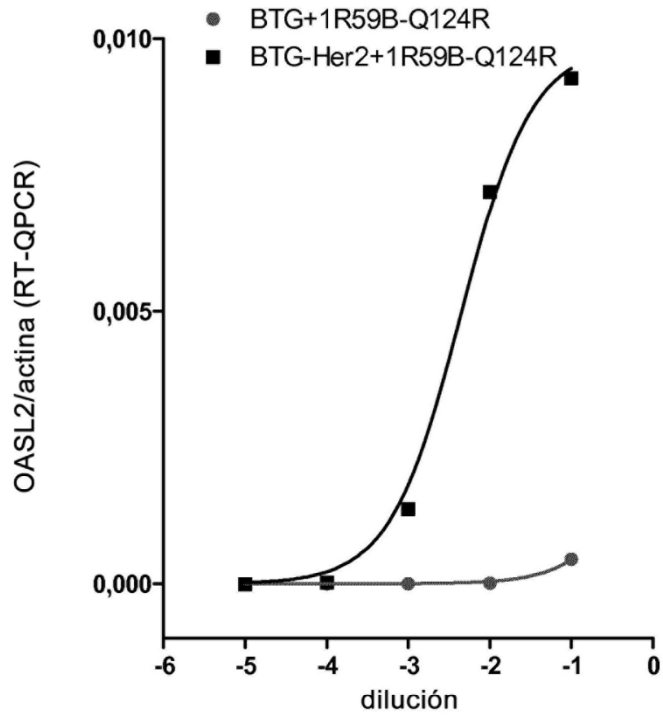


Figura 11

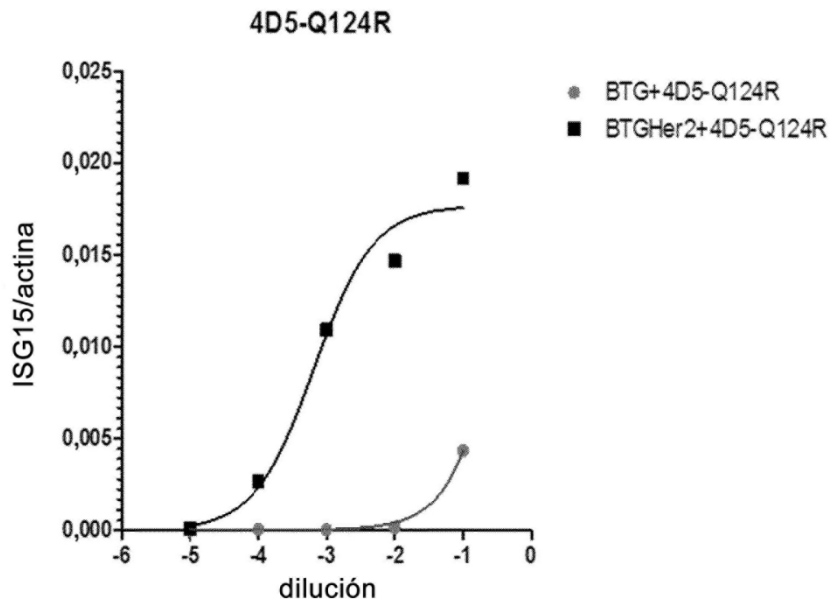


Figura 12

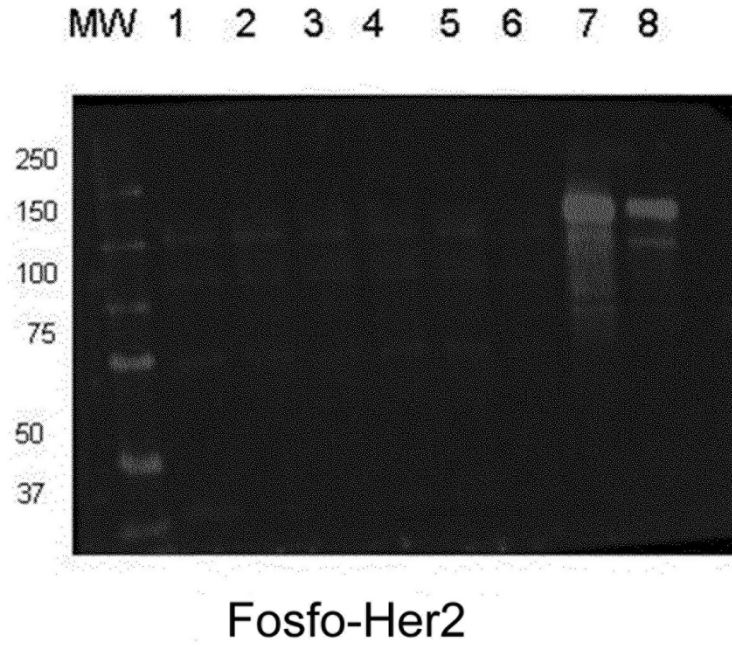


Figura 13

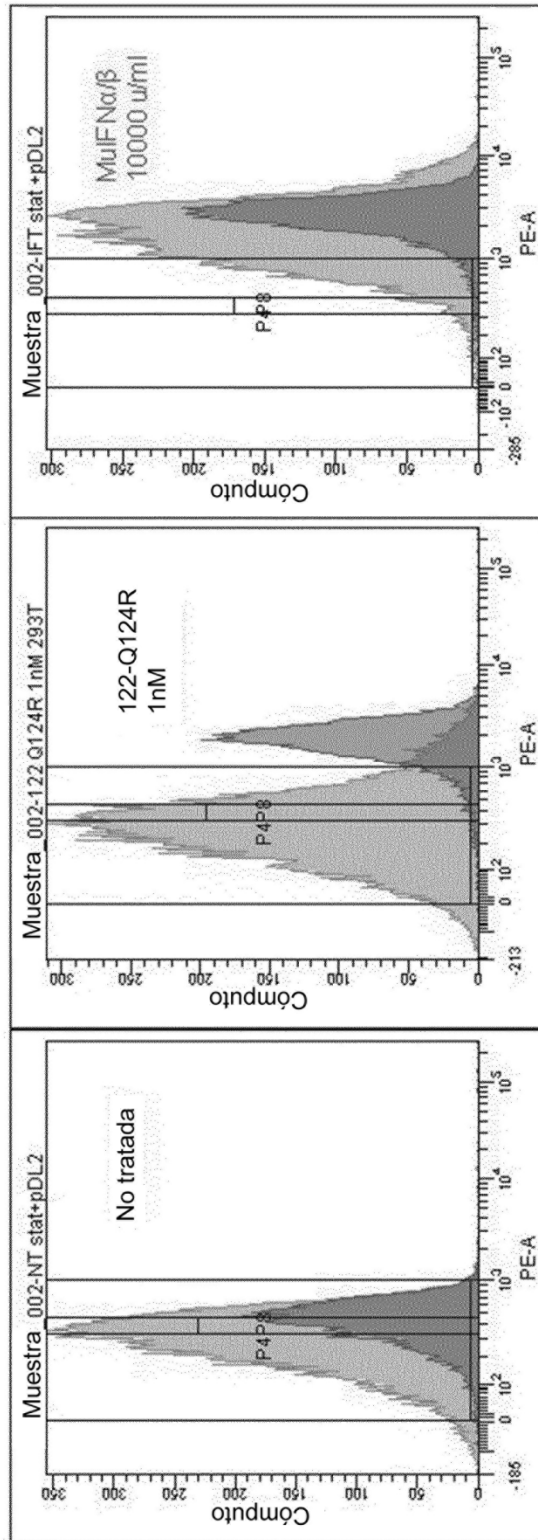


Figura 14

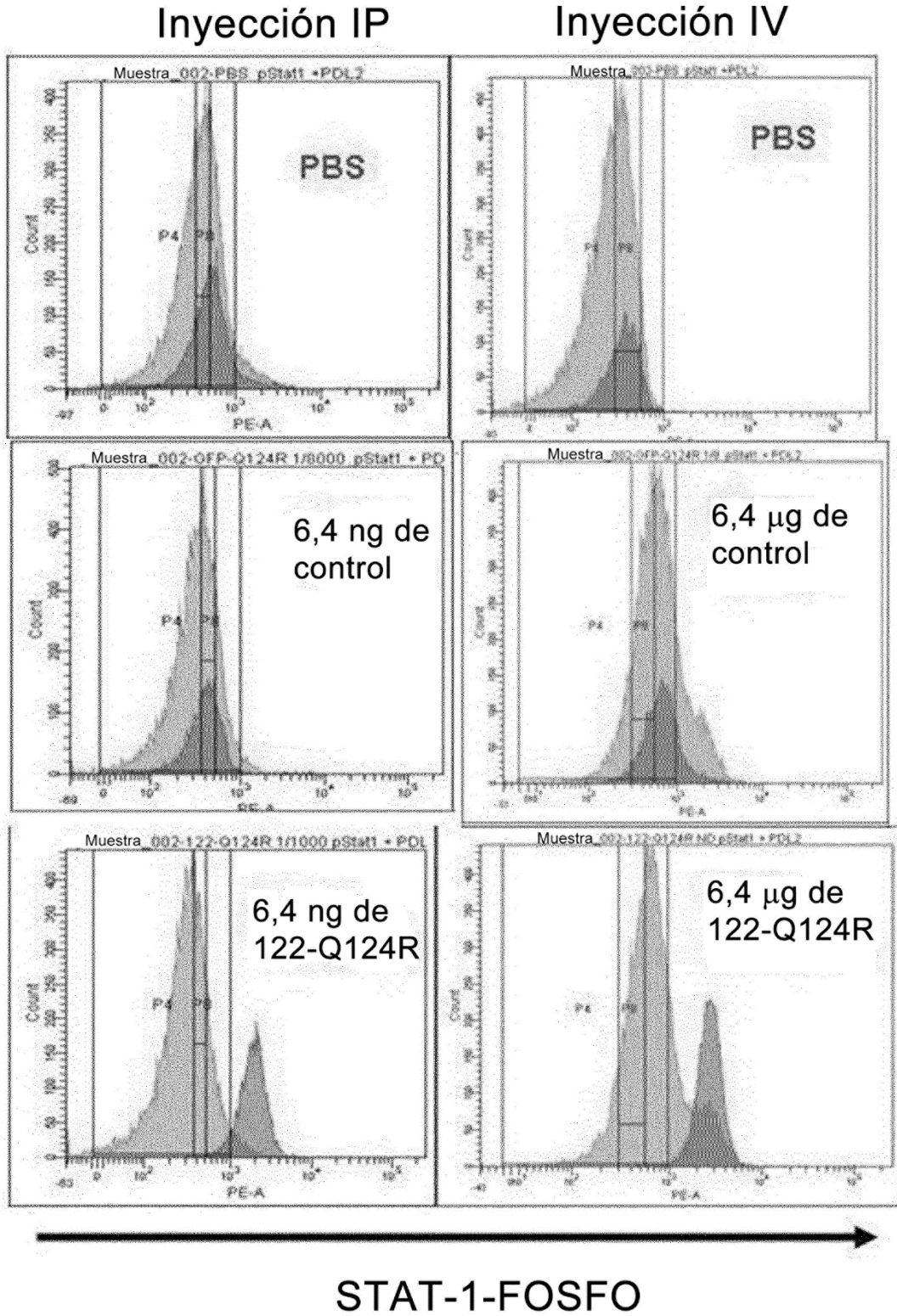


Figura 15

Inyección Nb 122-IFN...

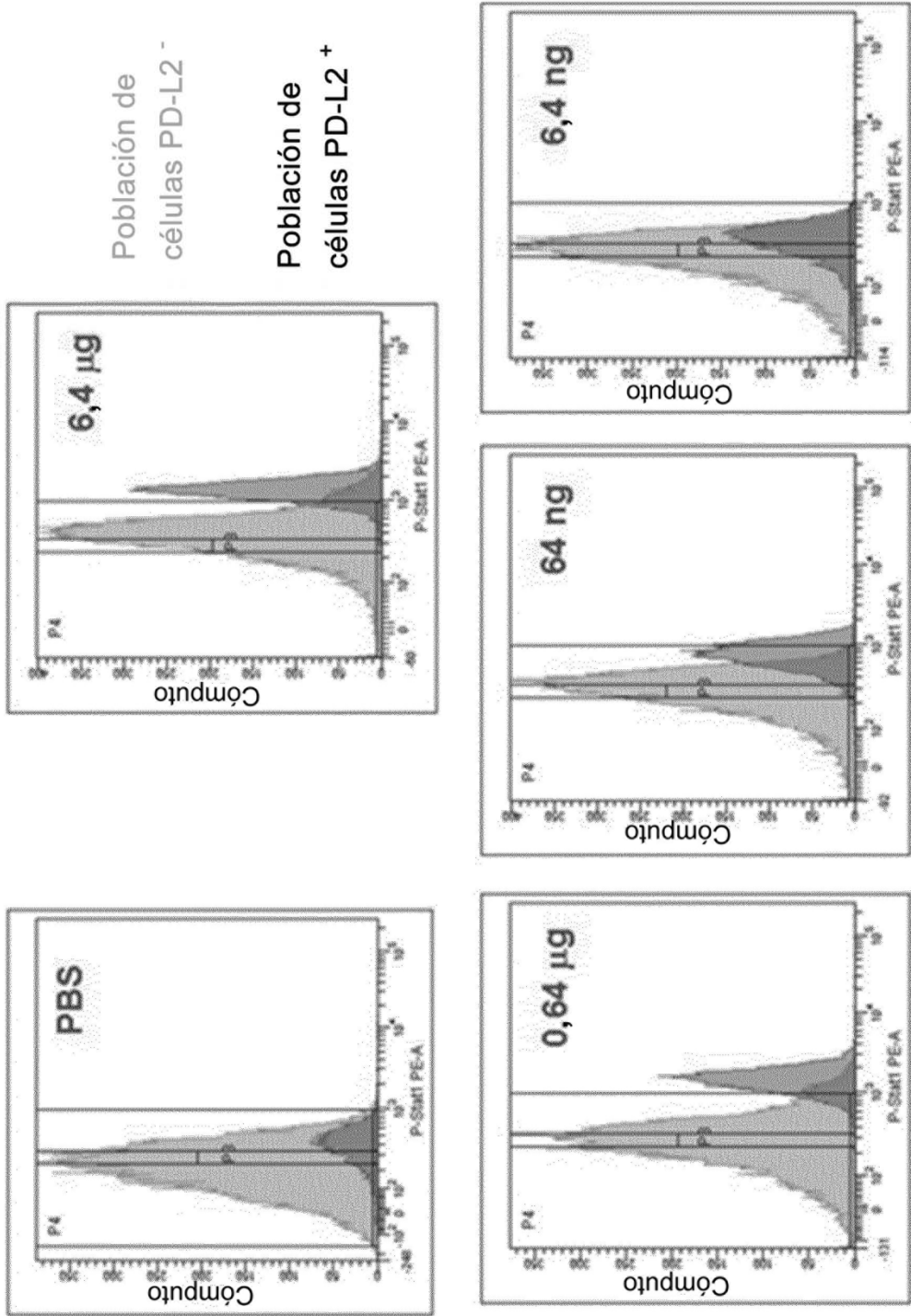


Figura 16

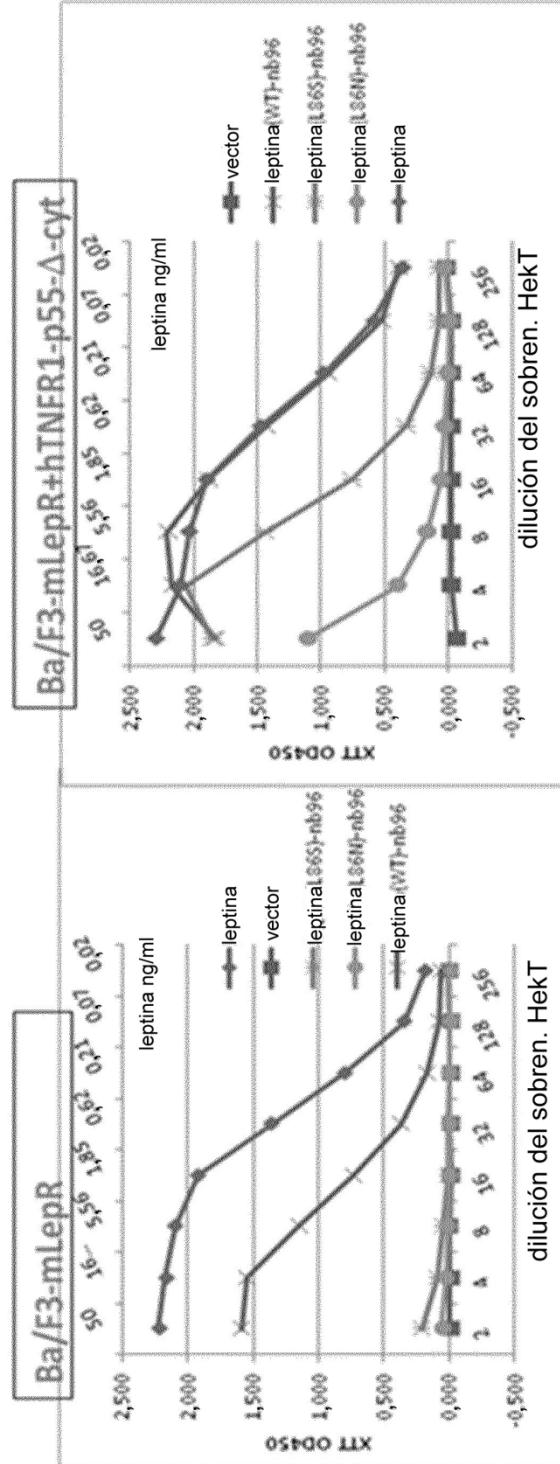


Figura 16 continuación

