

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 428**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2012 PCT/EP2012/064490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13014149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2012 E 12741305 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2736535**

54 Título: **Inmunocjugado de IL-12**

30 Prioridad:

27.07.2011 US 201161512190 P

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

28.03.2019

73 Titular/es:

**PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
La Lizza 7
53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

WULHFARD, SARAH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 706 428 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

Inmunoconjugado de IL-12

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un conjugado que comprende las subunidades p40 y p35 de interleucina 12 (IL-12) unidas y un diacuerpo de cadena sencilla, en el que el diacuerpo se une a fibronectina tal como se define en las reivindicaciones. En particular, se refiere a conjugados para seleccionar como diana la matriz extracelular (ECM) de tejidos, particularmente la neovasculatura tumoral, al uso terapéutico de tales conjugados en el tratamiento de una enfermedad/un trastorno, tal como cáncer o angiogénesis patológica. En particular, la invención se refiere a inmunocitocinas para el direccionamiento de IL-12 a antígenos expresados de manera selectiva en la ECM de la neovasculatura tumoral o a sitios de angiogénesis patológica.

15 **Antecedentes de la invención**

Las citocinas son mediadores clave de la inmunidad innata y adaptativa. Se han usado muchas citocinas para fines terapéuticos en pacientes con cáncer avanzado, pero su administración normalmente está asociada con toxicidad grave, lo que dificulta el aumento de la dosis hasta regímenes terapéuticamente activos y su desarrollo como fármacos anticancerígenos. Para superar estos problemas, se ha propuesto el uso de "inmunocitocinas" (es decir, citocinas fusionadas a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo), con el objetivo de concentrar la actividad de estimulación del sistema inmunitario en el sitio de enfermedad, a la vez que se evitan los tejidos normales¹⁻⁵.

La citocina heterodimérica interleucina-12 (IL-12) es un mediador clave de la inmunidad innata y celular con potente actividad antitumoral y antimetastásica⁶⁻⁸. Consiste en una subunidad p35 y una p40 unidas covalentemente mediante un puente disulfuro.

Nunca se ha detectado la secreción de la subunidad p35 aislada; en cambio, las células que producen el heterodímero de IL-12 biológicamente activo secretan p40 en forma libre en un exceso de 10-100 veces con respecto al heterodímero de IL-12; dependiendo del estímulo⁹. Nunca se ha observado una función biológica de p40 libre y su importancia fisiológica todavía está debatiéndose. Se producen homodímeros de p40 unidos mediante disulfuro en el ratón; los homodímeros de p40 murinos, a diferencia de p40 libre, tienen la capacidad de bloquear las funciones de IL-12 *in vitro* e *in vivo*¹⁰. Hasta ahora sólo se ha demostrado la existencia de homodímeros de p40 humanos en líneas celulares transfectadas con p40 y todavía está debatiéndose la relevancia fisiológica de los homodímeros de p40 humanos^{11,12}.

La IL-12 actúa principalmente sobre células T y NK. Las funciones más importantes de IL-12 son la sensibilización de las respuestas inmunitarias de células T auxiliares 1 (Th1) y la secreción de IFN- γ por las células NK¹³.

La IL-12 genera la respuesta de Th1 en tres modalidades: (i) promueve la diferenciación de células T indiferenciadas, durante el encuentro inicial con un antígeno, para dar una población de células Th1 que puede producir grandes cantidades de IFN- γ tras la activación¹⁴, (ii) sirve como coestímulo requerido para la secreción máxima de IFN- γ por las células Th1 diferenciadas que responden a un antígeno específico¹⁵, y (iii) estimula el desarrollo de células Th1 que producen IFN- γ a partir de poblaciones de células T de memoria en reposo que interactúan con un antígeno al que se han expuesto previamente¹⁶.

La IL-12 inhibe fuertemente la neovascularización y el IFN- γ parece desempeñar un papel crítico como mediador de los efectos antigangiogénicos de IL-12¹⁷. Se sabe que la proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10) es un potente inhibidor de la angiogénesis^{18,19}.

Sin embargo, al igual que con muchas otras citocinas, la administración de la IL-12 humana recombinante está asociada con toxicidad grave, lo que dificulta su desarrollo como fármaco anticancerígeno. Los ensayos clínicos en pacientes con cáncer han revelado actividades terapéuticas prometedoras, pero también han mostrado que la IL-12 humana recombinante es extremadamente tóxica para los seres humanos, con una dosis máxima tolerada de 0,5 g/kg de peso corporal^{20,21}.

Los efectos secundarios tóxicos de las toxinas, particularmente de citocinas tales como IL-12, han hecho difícil administrar una dosis eficaz y alcanzar altas concentraciones en el sitio de un tumor.

Anteriormente, los investigadores han intentado superar estos inconvenientes dirigiendo la administración de IL-12 al entorno tumoral y en particular a vasos sanguíneos tumorales (direccionamiento vascular tumoral). El direccionamiento vascular tumoral tiene como objetivo alterar la vasculatura tumoral, reduciendo el flujo sanguíneo para privar al tumor de oxígeno y nutrientes, produciendo la muerte de las células tumorales.

Se espera que una administración dirigida de IL-12 al entorno tumoral aumente el índice terapéutico de la citocina.

La concentración de citocinas, y en particular de IL-12, a nivel de los vasos sanguíneos tumorales es una estrategia terapéutica atractiva por varios motivos.

5 En primer lugar, la neovasculatura tumoral es más accesible a los agentes terapéuticos administrados por vía intravenosa que las células tumorales, lo que ayuda a evitar problemas asociados con la hipertensión intersticial de los tumores sólidos²².

10 En segundo lugar, la angiogénesis es característica de la mayoría de los tumores sólidos agresivos²³. La angiogénesis describe el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. Los tumores pueden inducir angiogénesis a través de la secreción de diversos factores de crecimiento (por ejemplo factor de crecimiento endotelial vascular). La angiogénesis tumoral permite que los tumores crezcan más allá de unos pocos milímetros de diámetro y también es un prerrequisito para la metástasis tumoral. Los vasos sanguíneos nuevos formados como resultado de la angiogénesis forman la neovasculatura del tumor o de las metástasis tumorales. El direccionamiento de IL-12 a la neovasculatura permitiría la inmunoterapia de una variedad de diferentes tipos tumorales.

15 En tercer lugar, la IL-12 muestra una actividad antiangiogénica conferida por su mediador posterior, IP-10^{17,24}.

20 Los extradominios A (ED-A) y B (ED-B) sometidos a corte y empalme alternativamente de la fibronectina y el dominio A1 de la tenascina-C representan tres de los marcadores mejor caracterizados de la angiogénesis y se ha notificado que se expresan alrededor de la neovasculatura y en el estroma de prácticamente todos los tipos de tumores sólidos agresivos. Además, incluso los cánceres no sólidos, tales como la leucemia, pueden ser susceptibles de tratamiento mediante la selección como diana de antígenos de la neovasculatura. El documento WO2011/015333 describió el tratamiento de la leucemia, incluyendo leucemia mielógena aguda, mediante la selección como diana de la neovasculatura de la médula ósea.

25 Se han desarrollado tres anticuerpos monoclonales humanos específicos para esas dianas y se han trasladado a ensayos clínicos: L19 (específico para ED-B)²⁵, F8 (específico para ED-A)²⁶ y F16 (específico para el dominio A1 de tenascina-C)²⁷.

30 Además, actualmente están investigándose varios derivados de anticuerpos, basándose en la modificación de L19, F8 o F16 con citocinas o radionúclidos de yodo, en ensayos clínicos de fase I y fase II en pacientes con cáncer y con artritis reumatoide^{28,29}. Estos agentes biofarmacéuticos se denominan L19-¹²⁴I, L19-¹³¹I, L19-IL2, L19-TNF, F8-IL10, F16-¹²⁴I, F16-¹³¹I, F16-IL2, indicando la naturaleza modular de estos derivados, en los que el resto de anticuerpo se usa para administrar una carga útil al sitio de enfermedad.

35 En el documento WO2008/120101, se demostró que un diacuerpo F8 marcado con I¹²⁵ dirigía selectivamente I¹²⁵ a tumores en ratones.

40 Se ha demostrado que un conjugado de diacuerpo F8-IL2 reduce la carga tumoral en ratones (documentos WO2008/120101, WO2010/078945).

45 Los investigadores han intentado mejorar el direccionamiento de IL-12 a la vasculatura usando conjugados de anticuerpo-IL-12. Halin *et al.* fusionaron secuencialmente los dominios p40 y p35 de la IL-12 heterodimérica usando un ligador (Ser₄Gly)₃ y los agregaron al extremo N-terminal del fragmento de anticuerpo scFv(L19). Esta inmunocitocina mostró una actividad terapéutica aumentada de IL-12; sin embargo, sólo se observó una modesta selección como diana de tumores³⁰.

50 Gafner *et al.* clonaron y sometieron a prueba satisfactoriamente una proteína de fusión heterodimérica en que las subunidades p35 y p40 unidas mediante disulfuro se fusionaron a scFv(L19)₃₁ para producir la proteína de fusión p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35 (véase también el documento WO2006/119897). Esta proteína de fusión heterodimérica mostró un excelente rendimiento en la selección como diana de tumores en estudios de biodistribución y una actividad terapéutica potenciada en comparación con el formato de Halin.

55 R. Somnavilla *et al.* dan a conocer un conjugado F8-IL-12. Las subunidades p40 y p35 de IL-12 están unidas entre sí. El anticuerpo F8 es un anticuerpo que se une al dominio ED-A de fibronectina. Tal como puede observarse en la figura 1 en la página 654, una molécula de anticuerpo está unida a la subunidad p35 y otra a la subunidad p40 de IL-12 (página 654, figura 1; pág. 654, col. 2, párrafo 1). Se da a conocer que el conjugado mostraba una impresionante actividad de selección como diana de tumores en un modelo de ratón (R. Somnavilla *et al.*: "Expression, engineering and characterization of the tumor-targeting heterodimeric immunocytokine F8- IL-12", PROTEIN ENGINEERING DESIGN AND SELECTION, vol. 23, n.º 8, 15 de junio de 2010 (2010-06-15), páginas 653-661).

Sumario de la invención

65 La presente invención se refiere a un conjugado que comprende las subunidades p40 y p35 de interleucina 12 (IL-12) unidas y un diacuerpo de cadena sencilla, en el que el diacuerpo se une a fibronectina tal como se define en las

reivindicaciones.

5 La invención se deriva del trabajo que comparó las capacidades de selección como diana de tumores de tres formatos de inmunocitocina anticuerpo-IL-12. Sorprendentemente, se descubrió un nuevo formato, que mejora la capacidad de selección como diana de tumores en comparación con los formatos conocidos. El nuevo formato también tiene las ventajas adicionales de producción y purificación más fáciles.

10 Tal como se muestra en los ejemplos, una proteína de fusión de cadena sencilla que comprende las subunidades p40 y p35 de IL-12 unidas a un diacuerpo F8 de cadena sencilla (p40p35F8F8), demuestra selección como diana de tumores mejorada *in vivo* en comparación con el formato de inmunocitocina scFv-IL-12-scFv descrito por Gafner *et al.*, documento WO2006/119897. En cambio, un diacuerpo F8-IL-12 (p40p35F8)x2, no muestra ninguna captación de tumor. Estos formatos se ilustran en la figura 2.

15 Por tanto, sorprendentemente, una inmunocitocina bivalente de cadena sencilla muestra un mejor perfil de biodistribución en comparación con los formatos conocidos anteriormente. Esto es destacable puesto que el formato heterodimérico descrito por Gafner *et al.* (documento WO2006/119897) ya mostró una biodistribución muy buena, y no se esperaba que un nuevo formato pudiera conservar o incluso mejorar adicionalmente este perfil de selección como diana.

20 Un conjugado que comprende las subunidades p40 y p35 de IL-12 unidas a una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno muestra capacidad de selección como diana de tumores excelente.

25 Además, a diferencia del formato heterodimérico de Gafner *et al.*, la inmunocitocina de la presente invención puede expresarse como un polipéptido de cadena sencilla, por ejemplo como una proteína de cadena sencilla que comprende las subunidades p40 y p35 de IL-12 unidas y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno. Este formato tiene la ventaja de ser más fácil de producir y purificar, puesto que consiste en una sola especie. Esto facilita la producción de material de calidad clínica. Además, la expresión de una inmunocitocina de cadena sencilla evita la homodimerización de la subunidad p35, que puede asociarse con la expresión independiente de las subunidades p35 y p40. La purificación de una inmunocitocina heterodimérica se facilita mediante el uso de marcadores peptídicos, pero estos deben retirarse para lograr el material de calidad clínica. La inmunocitocina de la presente invención ofrece una vía más sencilla para la purificación y producción, a la vez que mantiene e incluso mejora el perfil de biodistribución de productos anteriores.

35 Estos resultados tienen implicaciones terapéuticas significativas para el direccionamiento mejorado de IL-12 a tumores y otros sitios de angiogénesis patológica. Pueden usarse conjugados de la invención en el tratamiento de cáncer o el tratamiento de angiogénesis patológica. Las implicaciones más amplias también incluyen una variedad de otras aplicaciones que implican el direccionamiento de sustancias *in vivo*, incluyendo métodos de diagnóstico así como la prevención y el tratamiento de enfermedades y otros estados patológicos.

40 En un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende las subunidades p40 y p35 de interleucina 12 (IL-12) unidas y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno.

45 El conjugado puede ser o puede comprender una proteína de cadena sencilla. Cuando el conjugado es una proteína de cadena sencilla, toda la proteína puede expresarse como un solo polipéptido o proteína de fusión. Por ejemplo, el conjugado puede ser una proteína de cadena sencilla que comprende las subunidades p40 y p35 de IL-12 y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno. Alternativamente, el conjugado puede comprender un agente heterodimérico (por ejemplo IL-12) unido a la parte de selección como diana de cadena sencilla. Una subunidad del agente heterodimérico puede unirse mediante un enlace peptídico o ligador peptídico a la parte de selección como diana de cadena sencilla, y por tanto puede expresarse como una proteína de fusión, y luego ensamblarse con la otra subunidad. Por ejemplo, el conjugado puede comprender las subunidades p40 y p35 de IL-12 heterodiméricas, y una parte de selección como diana de cadena sencilla unida a una de las subunidades (por ejemplo p35), opcionalmente mediante un ligador peptídico.

55 La unión puede ser en el extremo N o C de la parte de selección como diana. En el presente documento se dan a conocer modos de unión adecuados. Preferiblemente, la subunidad p35 se une a la parte de selección como diana de cadena sencilla.

60 Preferiblemente, el conjugado contiene solo una IL-12. Preferiblemente, el conjugado contiene solo una de cada subunidad p35 y p40. Preferiblemente, el conjugado contiene solo una parte de selección como diana. Preferiblemente, la parte de selección como diana es bivalente, teniendo solo dos sitios de unión a antígeno. El conjugado puede ser una inmunocitocina, en la que uno o preferiblemente ambos sitios de unión a antígeno los proporciona una molécula de anticuerpo. Preferiblemente, la parte de selección como diana es un diacuerpo de cadena sencilla.

Preferiblemente, la parte de selección como diana está unida al extremo C-terminal de la subunidad p35. Por tanto, el conjugado puede tener el formato [p40]-[p35]-[parte de selección como diana]. Preferiblemente, la subunidad p40 tiene un extremo N-terminal libre, ya que se ha demostrado que esta disposición proporciona selección como diana de tumores mejorada *in vivo*.

5 Preferiblemente, la parte de selección como diana es un diacuerpo de cadena sencilla y se une a fibronectina (por ejemplo, al dominio ED-A o ED-B).

10 La parte de selección como diana puede comprender un sitio de unión a antígeno que tiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 expuestas en SEQ ID NO 9-14. El sitio de unión a antígeno puede comprender los dominios VH y/o VL del anticuerpo F8 expuestos en SEQ ID NO 23 y 24, respectivamente. La parte de selección como diana puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos del diacuerpo de cadena sencilla F8 expuesta en SEQ ID NO: 31.

15 Se conocen otros anticuerpos que pueden unirse a fibronectina, por ejemplo L19 (específico para ED-B).

Preferiblemente, el conjugado tiene un peso molecular de menos de 150 kDa, más preferiblemente de 140, 130, 120 kDa o menos. Preferiblemente, el conjugado tiene un peso molecular de entre 100 y 150 kDa, preferiblemente de entre 100 y 120 kDa.

20 El conjugado puede tener una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de aminoácidos de p40p35F8F8 (SEQ ID NO: 8).

25 El conjugado puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8. El conjugado puede codificarse por la secuencia de nucleótidos que consiste en o que comprende SEQ ID NO: 1.

30 La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican para conjugados de la invención. En el presente documento se dan a conocer ejemplos de secuencias de ácido nucleico codificantes. Puede usarse un ácido nucleico aislado para expresar la proteína de fusión de la invención, por ejemplo mediante expresión en una célula huésped de bacteria, levadura, insecto o mamífero. Una célula huésped preferida es *E. coli*. El ácido nucleico codificado se proporcionará generalmente en forma de un vector recombinante para expresión. Las células huésped *in vitro* que comprenden tales vectores forman parte de la invención, al igual que su uso para expresar las proteínas de fusión, que posteriormente pueden purificarse a partir de un cultivo celular y opcionalmente formularse para dar una composición farmacéutica.

35 Un conjugado o inmunocitocina de la invención puede proporcionarse por ejemplo en una composición farmacéutica, y puede emplearse para uso médico tal como se describe en el presente documento, o bien solo o bien en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de cáncer o de inhibición de la angiogénesis mediante el direccionamiento de IL-12 a la neovasculatura *in vivo*.

45 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1a muestra una representación esquemática de la proteína de fusión de diacuerpo de cadena sencilla F8-IL-12 (p40p35F8F8) (SEQ ID NO: 8), una realización de ejemplo de la presente invención. En esta realización, las subunidades p40 y p35 de IL-12 se fusionaron usando una secuencia de ligador (ligador peptídico/de aminoácido) y se conectaron por medio de un ligador a dos conjuntos de fragmentos de anticuerpo F8 (dos conjuntos de VH-VL). Cada VH y VL dentro del conjunto está conectado mediante un ligador entre las cadenas variable pesada (VH de F8) y variable ligera (VL de F8). Los ligadores dentro de cada conjunto no son lo suficientemente largos como para permitir el emparejamiento entre los dominios VH y VL. Cada conjunto de VH y VL está conectado mediante un ligador que es lo suficientemente largo como para permitir el emparejamiento entre los dominios VH y VL del primer conjunto con los dominios VH y VL complementarios del segundo conjunto. Los ligadores de aminoácido se muestran como rectángulos negros.

La figura 1b muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F8-IL-12 (p40p35F8F8). La secuencia se lee en la dirección N-C de la figura 1a. Cada una de las subunidades p40, p35, VH y VL están unidas mediante secuencias de ligador, que se muestran en gris. Las dos secuencias de VH de F8 están subrayadas. Cada secuencia de VH de F8 va seguida por una secuencia VL. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH y CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL se muestran en recuadros dentro de las secuencias de VH y VL. Las secuencias de aminoácidos de las CDR también se indican por separado (SEQ ID NO 9-14, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH de F8 y VL de F8 (SEQ ID NO 15 y 16, respectivamente); los dominios p40 y p35 de IL-12 (SEQ ID NO 17 y 18, respectivamente) y los ligadores peptídicos (SEQ ID NO 19-22) también se indican por separado a continuación.

La figura 2 muestra (A) la estructura del formato de inmunocitocina heterodimérica scFv-p30:p40-scFv de Gafner *et al.* ("antiguo formato"); (B) una proteína de fusión p40p35F8F8 de cadena sencilla según la invención; y (C) el diacuerpo F8 (p40p35F8)x2.

- 5 La figura 3a muestra la estrategia de clonación de p40p35F8F8.
- La figura 3b muestra la estrategia de clonación de (p40p35F8)x2.
- 10 La figura 4 muestra los resultados de un análisis de Biacore de p40p35F8F8 para calcular la KD (constante de afinidad de unión) aparente de la proteína al antígeno ED-A. Cada línea en el gráfico representa una repetición independiente de la proteína p40p35F8F8. La línea de arriba indica una KD de 0,15 mg/ml, la línea media indica una KD de 0,062 mg/ml, la línea de abajo indica una KD de 0,031 mg/ml.
- 15 La figura 5 muestra perfiles de filtración en gel del formato de diacuerpo de cadena sencilla de IL-12 y el formato de diacuerpo de IL-12 en comparación con el antiguo formato. A) muestra un perfil preparativo y analítico del formato F8hIL-12 (antiguo formato). B) y C) muestran perfiles preparativos y analíticos de los dos nuevos formatos. B) muestra el formato de diacuerpo de cadena sencilla p40p35F8, C) muestra el formato de diacuerpo (p40p35F8)x2.
- 20 La figura 6 muestra SDS page en condiciones reductoras y no reductoras para la proteína p40p35F8F8 (carriles 1 y 2) y la proteína (p40p35F8)x2 (carriles 3 y 4). Los carriles 1 y 3 muestran la proteína en condiciones no reductoras, los carriles 2 y 4 muestran la proteína en condiciones reductoras. La masa molecular calculada de p40p35F8F8 es de 110 kDa, la masa molecular calculada de (p40p35F8)x2 dimérica es de 170 kD.
- 25 La figura 7 muestra una comparación del rendimiento de selección como diana *in vivo* del antiguo formato heterodimérico (scFv-IL-12-scFv), el nuevo formato p40p35F8F8 y el nuevo formato (p40p35F8)x2 en un modelo de tumor de ratón. Los resultados se presentan en el orden: antiguo formato (barra negra), p40p35F8F8 (gris claro), (p40p35F8)x2 (gris oscuro).

30 Descripción detallada

La invención incluye la combinación de los aspectos y las características preferidas descritas excepto cuando tal combinación claramente no puede permitirse o se evita expresamente.

- 35 En un aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende una parte de agente terapéutico o de diagnóstico, tal como IL-12, y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno, tal como un diacuerpo de cadena sencilla.

40 Conjugado

- Los conjugados de la invención comprenden una parte de agente terapéutico o de diagnóstico, tal como IL-12, y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno.

- 45 El conjugado puede ser o puede comprender una proteína de cadena sencilla. Cuando el conjugado es una proteína de cadena sencilla, toda la proteína puede expresarse como un solo polipéptido. Por ejemplo, el conjugado puede ser una proteína de cadena sencilla que comprende las subunidades p40 y p35 de IL-12 y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno. La proteína de cadena sencilla puede ser una proteína de fusión, por ejemplo una proteína de fusión de cadena sencilla que comprende las subunidades p35 y p40 de IL-12 unidas, y una parte de selección como diana de cadena sencilla que comprende dos sitios de unión a antígeno. Por "proteína de fusión de cadena sencilla" quiere decirse un polipéptido que es un producto de traducción que resulta de la fusión de dos o más genes o secuencias codificantes de ácido nucleico para dar un marco de lectura abierto (ORF). Los productos de expresión fusionados de los dos genes en el ORF pueden conjugarse mediante un ligador peptídico codificado en marco. En el presente documento se describen ligadores peptídicos adecuados.

- 55 Sin embargo, también se prevé que no sea necesario que el agente terapéutico o de diagnóstico sea una cadena sencilla. Por ejemplo, las subunidades p40 y p35 de IL-12 pueden ser un heterodímero. El heterodímero puede unirse al extremo N o C de la parte de selección como diana de cadena sencilla. El heterodímero puede unirse a la parte de selección como diana de cadena sencilla por medio de la subunidad p40 o p35. La unión puede ser directa o puede ser indirecta, por ejemplo por medio de un ligador peptídico. Opcionalmente, una de las subunidades p35 o p40 puede unirse al agente de selección como diana de cadena sencilla de modo que una subunidad se expresa con el agente de selección como diana de cadena sencilla, y la segunda subunidad es una segunda cadena polipeptídica. Por tanto, las subunidades primera y segunda pueden formar un heterodímero, por ejemplo unido mediante uno o más enlaces disulfuro. Una subunidad puede unirse al extremo N o C de la parte de selección como diana o bien directamente o bien indirectamente, por ejemplo por medio de un ligador peptídico. En el presente documento se dan a conocer ligadores y modos de unión adecuados. Preferiblemente, la subunidad p35 se une a la

parte de selección como diana de cadena sencilla.

Parte de selección como diana

5 La parte de selección como diana es un diacuerpo de cadena sencilla que se une a fibronectina tal como se define en las reivindicaciones.

10 El término “molécula de anticuerpo” describe una inmunoglobulina ya se produzca de manera natural o de manera parcial o completamente sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que es, o es sustancialmente homólogo a, un dominio de unión de anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión de antígeno tales como diacuerpos de cadena sencilla. La molécula de anticuerpo o fragmento del mismo puede ser humano o humanizado. Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica para la región variable de inmunoglobulina, o las CDR de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de entramado, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética o a otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

20 Dado que los anticuerpos pueden modificarse de varias formas, el término “molécula de anticuerpo” debe interpretarse que cubre fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o completa o parcialmente sintética. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido. En los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 se describe la clonación y expresión de anticuerpos quiméricos.

30 El término “específico” puede usarse para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará una unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica(s). El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que se porta por varios antígenos, en cuyo caso la parte de selección como diana que porta el sitio de unión a antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que portan el epítipo.

35 La parte de selección como diana puede ser bivalente, es decir, tiene dos sitios de unión a antígeno. Un “sitio de unión a antígeno” describe la parte de un anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente a y que es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solo a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítipo. Puede proporcionarse un sitio de unión a antígeno por uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, un denominado fragmento de anticuerpo Fd que consiste en un dominio a VH). Preferiblemente, un sitio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

45 La parte de selección como diana puede comprender dos sitios de unión a antígeno, que pueden ser idénticos o diferentes. Preferiblemente, la parte de selección como diana comprende dos sitios de unión a antígeno, en los que cada sitio de unión se proporciona por un par de dominios VH-VL. Por ejemplo, una parte de selección como diana puede comprender dos pares de dominios VH-VL idénticos.

50 Cada uno de los sitios de unión a antígeno en la parte de selección como diana puede unirse al mismo antígeno o epítipo. Esto puede lograrse proporcionando sitios de unión a antígeno idénticos, o proporcionando dos sitios de unión a antígeno diferentes, por ejemplo que comprenden dominios VH y VL diferentes, que se unen ambos no obstante al mismo antígeno o epítipo. Alternativamente, la parte de selección como diana puede ser biespecífica, por ejemplo puede ser un diacuerpo de cadena sencilla biespecífico. Por “biespecífico” quiere decirse que cada uno de los sitios de unión a antígeno se une a un antígeno diferente. Opcionalmente, dos sitios de unión a antígeno pueden unirse a dos antígenos diferentes mencionados en el presente documento, por ejemplo dos antígenos diferentes de la matriz extracelular, o dos dominios diferentes de un antígeno particular (por ejemplo fibronectina o tenascina-C).

55 La parte de selección como diana es un diacuerpo de cadena sencilla.

60 Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando unidos los dos dominios (por ejemplo mediante un ligador peptídico) pero sin poder asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígeno se forman por la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento WO94/13804, también números de referencia 35 y 36) .

65 En un diacuerpo, un dominio variable de cadena pesada (VH) está conectado a un dominio variable de cadena ligera

(VL) en la misma cadena polipeptídica. Los dominios VH y VL están conectados mediante un ligador peptídico que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios (generalmente alrededor de 5 aminoácidos). Esto fuerza el emparejamiento con los dominios VH y VL complementarios de otra cadena. Un ejemplo de este formato se encuentra en la proteína (p40p35F8)x2 mostrada en la figura 2 (C). Tal como se muestra en la figura 7, esta proteína no mostró selección como diana de tumores *in vivo*.

Aunque los diacuerpos normales no son adecuados para su uso en la presente invención, un diacuerpo de cadena sencilla es adecuado y representa una realización preferida de la invención. En un diacuerpo de cadena sencilla dos conjuntos de dominios VH y VL están conectados entre sí en secuencia en la misma cadena polipeptídica. Por ejemplo, los dos conjuntos de dominios VH y VL pueden ensamblarse en una secuencia de cadena sencilla tal como sigue:

(VH-VL)--(VH-VL), donde los paréntesis indican un conjunto.

En el formato de diacuerpo de cadena sencilla, cada uno de los dominios VH y VL dentro de un conjunto está conectado mediante un ligador peptídico corto o "no flexible". Este tipo de secuencia de ligador peptídico no es lo suficientemente larga como para permitir el emparejamiento de los dominios VH y VL dentro del conjunto. Generalmente un ligador peptídico corto o "no flexible" tiene alrededor de 5 aminoácidos.

Los dos conjuntos de dominios VH y VL están conectados como una cadena sencilla mediante un ligador peptídico largo o "flexible". Este tipo de secuencia de ligador peptídico es suficientemente larga como para permitir el emparejamiento de los dominios VH y VL del primer conjunto con los dominios VH y VL complementarios del segundo conjunto. Generalmente, un ligador largo o "flexible" tiene alrededor de 15 aminoácidos.

Se han generado diacuerpos de cadena sencilla anteriormente³⁸. Un diacuerpo de cadena sencilla biespecífico se ha usado para dirigir adenovirus a células endoteliales³⁷.

Los diacuerpos y los diacuerpos de cadena sencilla pueden expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

La parte de selección como diana se une a fibronectina. La fibronectina es un antígeno sometido a corte y empalme alternativo, y se conocen varias isoformas de fibronectina alternativas, incluyendo alternativamente las isoformas sometidas a corte y empalme A-FN y B-FN, que comprenden los dominios ED-A o ED-B respectivamente, que son marcadores de angiogénesis conocidos. La parte de selección como diana puede unirse selectivamente a isoformas de fibronectina expresadas selectivamente en la neovasculatura. Un sitio de unión a antígeno en la parte de selección como diana de la invención puede unirse a la isoforma de fibronectina A-FN, por ejemplo puede unirse al dominio ED-A (extradominio A). Un sitio de unión a antígeno en la parte de selección como diana de la invención puede unirse a la isoforma de fibronectina B-FN, por ejemplo puede unirse a ED-B (extradominio B).

El extradominio-A (EDA o ED-A) de fibronectina también se conoce como ED, extra-repetición A de tipo III (EIIIA) o EDI. La secuencia de ED-A humano se ha publicado por Kornbliht *et al.* (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868 y Paoella *et al.* (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545-3557. La secuencia de ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (fibronectina tipo -III 12; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P02751. La secuencia de ratón ED-A está disponible de la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (fibronectina tipo-III 13; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P11276.

La isoforma ED-A de fibronectina (A-FN) contiene el extradominio-A (ED-A). La secuencia de la A-FN humana puede deducirse a partir de la secuencia precursora de fibronectina humana correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P02751. La secuencia de la A-FN de ratón puede deducirse a partir de la secuencia precursora de fibronectina de ratón correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P11276. La A-FN puede ser la isoforma ED-A humana de fibronectina. La ED-A puede ser el extradominio-A de la fibronectina humana.

ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) mediante corte y empalme alternativo y está ubicada entre los dominios 11 y 12 de FN³⁴. ED-A puede estar ausente principalmente en la forma plasmática de FN pero es abundante durante la embriogénesis, la remodelación tisular, la fibrosis, el trasplante de corazón y el crecimiento de tumores sólidos.

La isoforma B-FN de fibronectina es uno de los marcadores de angiogénesis mejor conocidos (documentos US 10/382.107, WO01/62298). Un extradominio "ED-B" de 91 aminoácidos se encuentra en la isoforma B-FN y es idéntico en ratón, rata, conejo, perro y hombre. B-FN se acumula alrededor de estructuras neovasculares en tumores agresivos y otros tejidos que experimentan angiogénesis, tales como el endometrio en la fase proliferativa y algunas estructuras oculares en estados patológicos, pero en cualquier caso es indetectable en tejido adulto normal.

La parte de selección como diana puede comprender un sitio de unión a antígeno que tiene las regiones

determinantes de complementariedad (CDR), o los dominios VH y/o VL de un anticuerpo que puede unirse específicamente a un antígeno de interés, por ejemplo, una o más CDR o dominios VH y/o VL de un anticuerpo que puede unirse específicamente a un antígeno de la ECM. El antígeno puede ser fibronectina, tal como se describió anteriormente.

5 Por tanto, la parte de selección como diana puede comprender un sitio de unión a antígeno del anticuerpo F8 o el anticuerpo L19, que han demostrado ambos unirse específicamente a antígenos de la ECM. La parte de selección como diana puede comprender un sitio de unión a antígeno que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR, o los dominios VH y/o VL del anticuerpo F8 o L19.

10 F8 es un fragmento de anticuerpo scFv monoclonal humano específico para el dominio ED-A sometido a corte y empalme alternativamente y se ha descrito anteriormente³³.

15 Un sitio de unión a antígeno puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR del anticuerpo F8. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de F8 son:

SEQ ID NO: 9 (VH de CDR1);

20 SEQ ID NO: 10 (VH de CDR2);

SEQ ID NO: 11 (VH de CDR3);

SEQ ID NO: 12 (VL de CDR1);

25 SEQ ID NO: 13 (VL de CDR2), y/o

SEQ ID NO: 14 (VL de CDR3).

30 Las SEQ ID NO 9-11 son las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de VH (1-3, respectivamente) del anticuerpo monoclonal humano F8. Las SEQ ID NO 12-14 son los aminoácidos de las regiones CDR de VL (1-3, respectivamente) del anticuerpo monoclonal humano F8. Las CDR de F8 mostradas en SEQ ID NO 9-14 se codifican por las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO 2-7, respectivamente.

35 La secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL del anticuerpo F8 se muestran en la figura 1b. La secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL de F8 corresponden a SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de los dominios VH y VL de F8 corresponden a SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente.

40 Un sitio de unión a antígeno puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR del anticuerpo L19. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de L19 son:

SEQ ID NO: 35 (VH de CDR1);

45 SEQ ID NO: 36 (VH de CDR2);

SEQ ID NO: 37 (VH de CDR3);

SEQ ID NO: 38 (VL de CDR1);

50 SEQ ID NO: 39 (VL de CDR2), y/o

SEQ ID NO: 40 (VL de CDR3).

55 SEQ ID NO 35-37 son las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de VH (1-3, respectivamente) del anticuerpo monoclonal humano L19. SEQ ID NO 38-40 son los aminoácidos de las regiones CDR de VL (1-3, respectivamente) del anticuerpo monoclonal humano L19.

60 La secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL del anticuerpo L19 corresponden a SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de scFv(L19) se facilita en SEQ ID NO: 41).

El conjugado puede comprender las subunidades p35 y p40 de IL-12 unidas, conectadas a un diacuerpo de cadena sencilla, por ejemplo un diacuerpo de cadena sencilla que comprende los dominios VH y VL del anticuerpo F8 o L19.

65 Un diacuerpo de cadena sencilla según la invención puede tener un dominio VH que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15

del dominio VH de F8 o la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33 del dominio VH de L9. El dominio VH puede codificarse por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de nucleótidos del dominio VH de F8 expuestas en SEQ ID NO: 23.

5 Un diacuerpo de cadena sencilla según la invención puede tener un dominio VL que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 del dominio VL de F8 o con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 34 de L9. El dominio VL puede codificarse por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de nucleótidos del dominio VL de F8 expuesta en SEQ ID NO: 24.

15 La identidad de secuencia se define comúnmente con referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelerlys Inc, San Diego, EE.UU.). GAP usa el algoritmo Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de apareamientos y minimiza el número de huecos. Generalmente, se usan parámetros por defecto, con una penalización por creación de hueco = 12 y una penalización por extensión de hueco = 4. Puede preferirse el uso de GAP, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo BLAST (que usa el método de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN de Altschul *et al.* (1990) citado anteriormente, que emplea generalmente parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402).

20 También pueden emplearse variantes de estos dominios VH y VL y CDR en moléculas de anticuerpo para su uso en conjugados tal como se describe en el presente documento. Pueden obtenerse variantes adecuadas por medio de métodos de alteración de secuencia, o mutación, y examen.

25 Las variantes particulares para su uso tal como se describe en el presente documento pueden incluir una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), que pueden ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1.

30 Las alteraciones pueden realizarse en una o más regiones de entramado y/o una o más CDR. En particular, las alteraciones pueden realizarse en CDR1 de VH, CDR2 de VH y/o CDR3 de VH.

35 La secuencia de aminoácidos del diacuerpo de F8 de cadena sencilla se encuentra en SEQ ID NO: 32. El diacuerpo F8 de cadena sencilla puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. La secuencia de nucleótidos que codifica para el diacuerpo F8 de cadena sencilla se encuentra en SEQ ID NO: 31.

40 Un diacuerpo de cadena sencilla según la invención puede tener una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de aminoácidos del diacuerpo F8 de cadena sencilla expuesta en SEQ ID NO: 32. Puede codificarse por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 31.

Ligadores

45 La parte de selección como diana y la parte de agente terapéutico o de diagnóstico pueden conectarse entre sí directamente, por ejemplo a través de cualquier enlace químico adecuado o a través de un ligador, por ejemplo un ligador peptídico.

50 El ligador peptídico puede ser una extensión de residuos de aminoácidos corta (2-20, preferiblemente 2-15). Se conocen en la técnica ejemplos adecuados de secuencias de ligador peptídico. Pueden usarse uno o más ligadores diferentes. El ligador puede tener aproximadamente 5 aminoácidos de longitud. Un ejemplo de un ligador adecuado es GSADGG (SEQ ID NO: 20) que se codifica por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 28.

55 El enlace químico puede ser, por ejemplo, un enlace covalente o iónico. Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen enlaces peptídicos (enlaces amida) y enlaces disulfuro. Por ejemplo, la parte de selección como diana y la parte de agente terapéutico o de diagnóstico pueden unirse covalentemente, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos (enlaces amida). Por tanto, la parte de selección como diana y la parte de agente terapéutico o de diagnóstico puede producirse (secretarse) como un polipéptido de cadena sencilla. Los componentes individuales que forman la parte de selección como diana o la parte de agente terapéutico o de diagnóstico pueden conectarse directamente, por ejemplo a través de cualquier enlace químico adecuado, o a través de un ligador, por ejemplo un ligador peptídico. Ejemplos de componentes individuales que pueden unirse dentro de la parte de selección como diana son secuencias de CDR o VH o VL. Ejemplos de componentes individuales dentro de la parte de agente

terapéutico o de diagnóstico son subunidades de citocina, tales como las subunidades p35 y p40 de IL-12.

Por ejemplo, cuando la parte de selección como diana comprende dos conjuntos de secuencias de VH y VL, por ejemplo, cuando un diacuerpo de cadena sencilla, preferiblemente los conjuntos de secuencias primero y segundo de VH y VL se conectan mediante un ligador peptídico flexible. Por "flexible" quiere decirse una secuencia de ligador que es suficientemente larga como para permitir el emparejamiento de los dominios VH y VL del primer conjunto con los dominios VH y VL complementarios del segundo conjunto. Un ejemplo de un ligador de este tipo es SSSSGSSSSGSSSSG (SEQ ID NO: 22), que se codifica por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 30. Preferiblemente, las secuencias de VH-VL dentro de cada conjunto están conectadas por un ligador "no flexible". Por ligador "no flexible" quiere decirse una secuencia de ligador peptídico que no es lo suficientemente larga como para permitir el emparejamiento de los dominios VH y VL. Un ejemplo de una secuencia de ligador corta es GGSGG (SEQ ID NO: 21) que se codifica por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 29. Subunidades de citocina individuales, tales como los dominios p40 y p35 de IL-12, también pueden conectarse mediante una secuencia de ligador. Un ejemplo de una secuencia de ligador adecuada es GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19), que se codifica por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 27.

Peso molecular

Se conocen en la técnica métodos de determinación del peso molecular de una proteína, por ejemplo SDS-PAGE. Este puede ser el peso molecular medido real con o sin glicosilación. Un ejemplo de un método para determinar el peso molecular es SDS-PAGE tal como se describe en el ejemplo 1 y se muestra en la figura 6. Alternativamente, el peso molecular puede ser un valor estimado basado, por ejemplo, en el peso molecular esperado del conjugado con o, normalmente, sin glicosilación. Pueden encontrarse métodos para determinar el peso molecular en libros de texto convencionales, por ejemplo Molecular biomethods handbook, segunda edición (2008) Humana Press, editado por John M. Walquer y Ralph Rapley.

Agente terapéutico o de diagnóstico

El agente terapéutico o de diagnóstico puede comprender dos subunidades (es decir, un par de subunidades), las subunidades p40 y p35 de IL-12.

El agente terapéutico o de diagnóstico puede ser una proteína de cadena sencilla, por ejemplo una proteína de fusión de cadena sencilla. Por ejemplo, las subunidades p35 y p40 de IL-12 pueden unirse (por ejemplo directamente o mediante una secuencia de ligador peptídico) como una cadena sencilla polipeptídica. Alternativamente, solo una de las subunidades p35 o p40 puede producirse (expresarse) como una proteína de cadena sencilla junto con la parte de selección como diana de cadena sencilla. La segunda subunidad es una segunda cadena polipeptídica, que entonces se une a la primera subunidad como un heterodímero. Las subunidades del heterodímero, por ejemplo las subunidades p35 y p40 de IL-12 pueden unirse covalentemente. En otra parte de este documento se describen formas de unión covalente. Preferiblemente, cuando se usa IL-12 heterodimérica en un conjugado de la invención, las subunidades se unen mediante uno o más enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro unen las subunidades de IL-12 natural, y por tanto esta forma nativa puede ser ventajosa para la actividad funcional.

Subunidades p35 y p40 de IL-12.

El agente terapéutico es IL-12, o una subunidad o subunidades de la misma. La IL-12 o subunidades de la misma útiles en la invención pueden derivarse de cualquier animal, por ejemplo ser humano, roedor (por ejemplo rata, ratón), caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, etc. La IL-12 humana se prefiere en conjugados para su administración a seres humanos. La IL-12 se produce de manera natural como una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad de 40 kDa (p40) y una subunidad de 35 kDa (p35). Los pesos moleculares reales de las subunidades pueden variar, por ejemplo cuando se expresan en diferente especies y dependiendo de si la proteína está glicosilada y del patrón de glicosilación. Por tanto, los términos "p40" y "p35" no implican que las subunidades tengan pesos moleculares de exactamente 40 y 35 kDa respectivamente. En cambio, estos términos se usan para identificar y distinguir las dos subunidades de IL-12, que pueden definirse más precisamente en lo que se refiere a sus secuencias de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad p40 de IL-12 se expone en SEQ ID NO: 17; la secuencia de aminoácidos de la subunidad p35 de IL-12 se expone en SEQ ID NO: 18. La secuencia de nucleótidos que codifica para la subunidad p40 de IL-12 se expone en SEQ ID NO: 25; la secuencia de nucleótidos que codifica para la subunidad p35 de IL-12 se expone en SEQ ID NO: 26.

Normalmente, la subunidad p35 tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18. La subunidad p35 puede codificarse por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el

100%, con SEQ ID NO: 26.

5 La subunidad p40 puede tener una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17. La subunidad p40 puede codificarse por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%, con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 25.

10 IL-12 en conjugados de la invención conserva una actividad biológica de IL-12, por ejemplo una capacidad para actuar como factor de crecimiento para células T y NK activadas, para potenciar la actividad lítica de células NK/citotóxicas activadas por linfocinas, para estimular la producción de IFN- γ por PMBC en reposo, para inhibir la angiogénesis (por ejemplo a través del mediador posterior IP-10), y/o para inhibir el crecimiento tumoral y/o la metástasis.

15 El agente terapéutico puede comprender una sola proteína de fusión de IL-12 que comprende las subunidades p35 y p40 de IL-12 unidas.

20 Las subunidades pueden unirse entre sí mediante cualquier enlace químico adecuado. Por ejemplo un enlace covalente o un enlace iónico. Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen enlaces peptídicos (enlaces amida) y enlaces disulfuro.

25 Las subunidades p35 y p40 de IL-12 pueden unirse covalentemente. El enlace covalente puede ser uno o más enlaces disulfuro. La invención permite por tanto el uso y el mantenimiento de un formato natural de las subunidades IL-12 en el conjugado.

30 Alternativamente, las subunidades p35 y p40 de IL-12 pueden unirse mediante enlaces peptídicos (enlaces amida), opcionalmente a través de un ligador peptídico, tal como se describió anteriormente. Por tanto, las subunidades p35 y p40 pueden producirse (secretarse) como un polipéptido de cadena sencilla.

35 El agente terapéutico o de diagnóstico puede comprender o consistir en las subunidades p35 y p40 de IL-12. Las subunidades pueden ser una cadena sencilla, por ejemplo una proteína de fusión de cadena sencilla de p35 y p40. El agente terapéutico o de diagnóstico puede comprender o consistir en las subunidades p35 y p40 como un heterodímero (proteína heterodimérica).

40 Las subunidades p35 y p40 de IL-12 pueden unirse entre sí en cualquier orden. Por ejemplo, el extremo N-terminal de la subunidad p35 puede conjugarse con el extremo C-terminal de la subunidad p40 o el extremo N-terminal de la subunidad p40 puede conjugarse con el extremo C-terminal de la subunidad p35. Preferiblemente, el extremo N-terminal de la subunidad p35 se conjuga con el extremo C-terminal de la subunidad p40.

La parte de selección como diana puede conjugarse con sólo una de las subunidades p40 o p35.

45 La parte de selección como diana puede conjugarse con o bien el extremo C-terminal o bien el extremo N-terminal de la subunidad p40 o la subunidad p35, dependiendo de la orientación relativa de las subunidades de IL-12 unidas en el conjugado. Por ejemplo, la parte de selección como diana puede conjugarse con el extremo C-terminal de la subunidad p35, el extremo C-terminal de la subunidad p40, el extremo N-terminal de la subunidad p40 o el extremo N-terminal de la subunidad p35. Preferiblemente, la parte de selección como diana se conjuga con el extremo C-terminal de la subunidad p35.

50 La subunidad que no está conjugada con la parte de selección como diana puede tener un extremo amino o carboxilo terminal libre. De nuevo esto depende del orden en que se unan entre sí las subunidades. Por ejemplo, cuando la parte de selección como diana está conjugada con el extremo C-terminal de la subunidad p35, la subunidad p40 puede tener un extremo N-terminal libre. Cuando la parte de selección como diana está conjugada con el extremo C-terminal de la subunidad p40, la subunidad p35 puede tener un extremo N-terminal libre. Cuando la parte de selección como diana está conjugada con el extremo N-terminal de la subunidad p40, la subunidad p35 puede tener un extremo N-terminal libre. Cuando la parte de selección como diana está conjugada con el extremo N-terminal de la subunidad p35, la subunidad p40 puede tener un extremo N-terminal libre.

60 Preferiblemente, la parte de selección como diana se une a la subunidad p35. Preferiblemente, la subunidad p40 tiene un extremo N-terminal libre (no fusionado). Cuando la subunidad p40 tiene un extremo N-terminal libre, se cree que esto maximiza su actividad.

Métodos de tratamiento

65 En un segundo aspecto, un conjugado según la invención puede usarse en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad

o trastorno en un paciente (normalmente un paciente humano) que comprende administrar el conjugado al paciente.

Por consiguiente, tales aspectos de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de este tipo para el tratamiento de un estado o enfermedad, y un método de preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el conjugado de la presente invención con un portador o excipiente fisiológicamente aceptable.

Por tanto, un conjugado tal como se describe en el presente documento puede usarse en un método de tratamiento de cáncer o de inhibición de la angiogénesis dirigiendo un agente a la neovasculatura *in vivo*. El agente puede ser cualquier agente terapéutico o de diagnóstico comentado en el presente documento. En particular una citocina, tal como IL-12.

Por tanto, un conjugado tal como se describe en el presente documento puede usarse en un método de tratamiento de cáncer o de inhibición de la angiogénesis mediante el direccionamiento de IL-12 a la neovasculatura *in vivo*.

Los estados que pueden tratarse usando el conjugado tal como se describe en el presente documento incluyen cáncer, otros tumores y estados neoplásicos. El conjugado puede usarse para inhibir la angiogénesis y de ese modo tratar artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración muscular relacionada con la edad, angiomas, tumores y cáncer. El tratamiento puede incluir tratamiento profiláctico. El conjugado también puede administrarse en métodos de diagnóstico, por ejemplo selección como diana y diagnóstico de angiogénesis, que puede estar asociada con cualquiera de los estados anteriores. También pueden diagnosticarse y tratarse otras enfermedades y estados, según la naturaleza del agente terapéutico o de diagnóstico proteico contenido en el conjugado, y la especificidad de la parte de selección como diana.

Cánceres adecuados para su tratamiento tal como se describe en el presente documento incluyen cualquier tipo de cáncer sólido o no sólido o linfoma maligno y especialmente cáncer de hígado, linfoma, leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda), sarcomas, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de estómago y cáncer cerebral. Los cánceres pueden ser familiares o esporádicos. Los cánceres pueden ser metastásicos o no metastásicos.

Preferiblemente, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo de cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, sarcoma (por ejemplo, tumor estromal gastrointestinal), cáncer de piel (por ejemplo melanoma), cáncer colorrectal y tumores neuroendocrinos.

El cáncer puede expresar una isoforma de fibronectina que comprende el dominio ED-A o ED-B. Preferiblemente, el cáncer expresa la isoforma ED-A de fibronectina.

La expresión de la isoforma ED-A de fibronectina se ha notificado en varios cánceres diferentes incluyendo cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de hígado, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y melanoma (Lohi *et al.* 1995, Jacobs *et al.* 2002, Matsumoto *et al.* 1999, Oyama *et al.* 1989, Tavian *et al.* 1994, Borsi *et al.* 1987).

Composiciones farmacéuticas

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un conjugado de la invención y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden normalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado según la invención y opcionalmente sustancias auxiliares tales como excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). Dichas composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. Un portador o excipiente puede ser un material líquido que puede servir como vehículo o medio para el principio activo. Los portadores o excipientes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, estabilizadores, antioxidantes, sustancias de regulación del pH, excipientes de liberación controlada. La preparación farmacéutica de la invención puede estar adaptada, por ejemplo, para uso parenteral y puede administrarse al paciente en forma de disoluciones o similares.

Pueden administrarse a un paciente composiciones que comprenden el conjugado de la presente invención. La administración se realiza preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esto suficiente para mostrar beneficio para el paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la tasa y curso temporal de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos de familia y otros médicos. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, de dos veces a la semana, semanales o mensuales, según el criterio del médico.

Los conjugados de la invención pueden administrarse a un paciente que necesita el tratamiento por medio de cualquier vía adecuada, habitualmente mediante inyección en el torrente sanguíneo y/o directamente en el sitio que

va a tratarse, por ejemplo el tumor o la vasculatura tumoral. La dosis precisa y su frecuencia de administración dependerán de varios factores, la vía de tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona que va a tratarse (por ejemplo, un tumor).

5 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un portador líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

10 Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica podrán preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

15 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, o bien simultáneamente o bien secuencialmente dependiendo del estado que va a tratarse. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de analgésicos tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina o antieméticos.

Kits

25 Otro aspecto de la invención proporciona un kit terapéutico para su uso en el tratamiento de cáncer o angiogénesis que comprende un conjugado tal como se describe en el presente documento. Los componentes de un kit son preferiblemente estériles y están en viales sellados u otros recipientes.

30 Un kit puede comprender además instrucciones para el uso de los componentes en un método descrito en el presente documento. Los componentes del kit pueden estar comprendidos o envasados en un recipiente, por ejemplo una bolsa, caja, frasco, bote o paquete de blíster.

Terminología

35 “Y/o” cuando se usan en el presente documento ha de considerarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo “A y/o B” ha de considerarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

40 Diversos aspectos adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación. La presente invención se ilustrará ahora a modo de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

45 Se describen aquí la producción y caracterización de conjugados de F8-IL-12 en dos formatos diferentes y una comparación de estos dos formatos con un F8-IL-12 de formato antiguo, demostrando de ese modo la superioridad del formato de diacuerpo de cadena sencilla tal como se reivindica en el presente documento para el direccionamiento *in vivo*.

Ejemplo 1. Clonación de dos nuevas inmunocitocinas basadas en IL-12

50 Clonación de p40p35F8F8:

55 Se fusionaron las subunidades p40 y p35 de IL-12 usando un ligador de 15 aminoácidos. Se conectaron dos fragmentos de anticuerpo scFv(F8) que contenían un ligador corto de 5 aminoácidos entre la cadena pesada y la ligera usando un ligador de 15 aminoácidos. Entonces se unió este fragmento de diacuerpo de cadena sencilla a la proteína de fusión p35p40 por medio de un ligador de 6 aminoácidos. La estrategia de clonación se muestra en la figura 3a. El constructo se clonó en el vector pcDNA 3.1 para la expresión en células de mamífero.

Clonación de (p40p35F8)x2:

60 Se conectaron las subunidades p40 y p35 de IL-12 usando un ligador de 15 aminoácidos y se fusionaron al diacuerpo scFv(F8) del extremo N-terminal usando un ligador de 6 aminoácidos. La estrategia de clonación se muestra en la figura 3b. Se clonó el constructo en el vector pcDNA 3.1.

65 Tanto las proteínas p40p35F8F8 como (p40p35F8)x2 se purificaron satisfactoriamente a partir del medio mediante cromatografía de afinidad de proteína A y se analizaron mediante SDS-PAGE y filtración en gel rápida de

cromatografía líquida de proteínas usando una columna de exclusión molecular Superdex TM 200 10/300GL.

Los perfiles de filtración en gel de las proteínas p40p35F8F8 y (p40p35F8)x2 se muestran en la figura 5 junto con el perfil de filtración en gel de la proteína F8 IL-12 de "antiguo formato". Los resultados mostrados en la figura 5 demuestran que es más fácil purificar la proteína p40p35F8F8 en comparación con la proteína F8 IL-12 en el antiguo formato.

Al usar SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, se encontró que la masa molecular calculada de p40p35F8F8 era de 110 kDa y se encontró que la masa molecular calculada de la (p40p35F8)x2 dimérica era de 170 kD (figura 6).

Ejemplo 2 – Cálculo del valor de KD de p40p35F8F8

Se determinó el valor de KD aparente de la proteína de fusión de cadena sencilla p40p35F8F8 mediante Biacore sobre un chip recubierto con antigeno.

El análisis de BIAcore produjo un gráfico (mostrado en la figura 4) para la proteína p40p35F8F8 que se analizó para deducir la afinidad de un anticuerpo para el antígeno ED-A. El eje x de cada gráfico se corresponde con el tiempo y el eje y se corresponde con unidades de resonancia (una medida que indica la afinidad de unión del anticuerpo sometido a prueba por el antígeno recubierto sobre el chip BIAcore).

La parte ascendente de cada gráfico representa la fase de asociación. Cuanto más empinada sea la curva en esta parte del gráfico, más rápida es la asociación del anticuerpo con el antígeno. La parte descendente de cada gráfico representa la fase de disociación del anticuerpo del antígeno. Cuanto más plana sea la curva en esta parte del gráfico, más lenta es la disociación del anticuerpo del antígeno.

Ejemplo 3 – Rendimiento de selección como diana *in vivo*: Biodistribución

Con el fin de evaluar el rendimiento de selección como diana *in vivo*, las proteínas p40p35F8F8 y (p40p35F8)x2 se radiyodaron con ¹²⁵I y cloramina-T, y se purificaron sobre una columna PD-10. Se inyectó por vía intravenosa el anticuerpo radiomarcado en cuatro ratones 129 SVE que portaban tumores F9 subcutáneos. Se sacrificaron los ratones 24 horas después de la inyección. Se pesaron los órganos y se contó la radioactividad usando un contador Cobra™ γ. El contenido de radioactividad de órganos representativos se expresa como porcentaje de la media ± EE de la dosis inyectada por gramo de tejido. Los resultados de este experimento se ilustran en la figura 7.

La inmunocitocina (p40p35F8)x2 no mostró ninguna captación tumoral. Tanto la proteína de antiguo formato como p40p35F8F8 mostraron buena captación tumoral y similares razones de tumor con respecto a sangre. Sin embargo, las razones de tumor con respecto a órgano fueron superiores para la nueva inmunocitocina p40p35F8F8 en comparación con el antiguo formato (6:1 frente a 4:1). Dado que la proteína de antiguo formato y la proteína p40p35F8F8 tenían pesos moleculares similares, la mejora observada en la captación tumoral para el nuevo formato no pudo explicarse mediante, por ejemplo, el nuevo formato que tenía penetración mejorada debido a que es una molécula más pequeña.

En general, la nueva proteína de fusión de IL-12 p40p35F8F8 muestra varias ventajas con respecto al antiguo formato. Es más fácil de producir y purificar puesto que consiste en una única especie, lo cual facilitará la producción. Además, muestra captación tumoral mejorada *in vivo*.

Bibliografía

1. Savage, P., So, A., Spooner, R.A. & Epenetos, A.A. A recombinant single chain antibody interleukin-2 fusion protein. Br J Cancer 67, 304-310 (1993).
2. Schrama, D., Reisfeld, R.A. & Becker, J.C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov 5, 147-159 (2006).
3. Neri, D. & Bicknell, R. Tumour vascular targeting. Nat Rev Cancer 5, 436-446 (2005).
4. Dela Cruz, J.S., Huang, T.H., Penichet, M.L. & Morrison, S.L. Antibody-cytokine fusion proteins: innovative weapons in the war against cancer. Clin Exp Med 4, 57-64 (2004).
5. Reisfeld, R.A., Becker, J.C. & Gillies, S.D. Immunocytokines: a new approach to immunotherapy of melanoma. Melanoma Res 7 suppl. 2, S99-106 (1997).
6. Rodolfo, M. & Colombo, M.P. Interleukin-12 as an adjuvant for cancer immunotherapy. Methods 19, 114-120 (1999).

7. Tsung, K., Meko, J.B., Peplinski, G.R., Tsung, Y.L. & Norton, J.A. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158, 3359-3365 (1997).
- 5 8. Brunda, M.J., *et al.* Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 178, 1223-1230 (1993).
9. D'Andrea, A., *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 176, 1387-1398 (1992).
- 10 10. Gillessen, S., *et al.* Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25, 200-206 (1995).
11. Ling, P., *et al.* Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 154, 116-127 (1995).
- 15 12. Carra, G., Gerosa, F. & Trinchieri, G. Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. *J Immunol* 164, 4752-4761 (2000).
13. Nastala, C.L., *et al.* Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 153, 1697-1706 (1994).
- 20 14. Magram, J., *et al.* IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4, 471-481 (1996).
- 25 15. Murphy, E.E., *et al.* B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 180, 223-231 (1994).
16. Manetti, R., *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177, 1199-1204 (1993).
- 30 17. Voest, E.E., *et al.* Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 87, 581-586 (1995).
18. Angiolillo, A.L., *et al.* Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182, 155-162 (1995).
- 35 19. Angiolillo, A.L., Sgadari, C. & Tosato, G. A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci* 795, 158-167 (1996).
20. Atkins, M.B., *et al.* Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3, 409-417 (1997).
- 40 21. Gollob, J.A., *et al.* Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin Cancer Res* 6, 1678-1692 (2000).
- 45 22. Jain, R.K. & Baxter, L.T. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res* 48, 7022-7032 (1988).
- 50 23. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31 (1995).
24. Duda, D.G., *et al.* Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 60, 1111-1116 (2000).
- 55 25. Pini, A., *et al.* Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 273, 21769-21776 (1998).
26. Villa, A., *et al.* A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *Int J Cancer* 122, 2405-2413 (2008).
- 60 27. Brack, S.S., Silacci, M., Birchler, M. & Neri, D. Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C. *Clin Cancer Res* 12, 3200-3208 (2006).
28. Sauer, S., *et al.* Expression of the oncofetal ED-B containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B targeted 131I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* (2009).
- 65

29. Johanssen, M., *et al.* The tumour-targeting human L19-IL2 immunocytokine: preclinical safety studies, phase I clinical trial in patients with solid tumours and expansion into patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 46, 2926-2935 (2010).
- 5 30. Halin, C., *et al.* Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nat Biotechnol* 20, 264-269 (2002).
31. Gafner, V., Trachsel, E. & Neri, D. An engineered antibody-interleukin-12 fusion protein with enhanced tumor vascular targeting properties. *Int J Cancer* 119, 2205-2212 (2006).
- 10 32. Hudson, P., Kortt, A. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods*. Volumen 231, temas 1-2, páginas 177-189 (2000).
33. Villa A *et al.* *Int. J. Cancer*. 1 de junio de 2008; 122 (11): 2405-13.
- 15 34. Borsi *et al.* (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595-600
35. Holliger and Winter. Diabodies: small bispecific antibody fragments. *Cancer Immunol Immunother* (1997) 45: 128-130.
- 20 36. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993
37. Nettelbeck, D.M; Miller, D.W; Jérôme, V; Zuzarte, M; Watkins, S. J; Hawkins, R.E; Müller, R; y Kontermann, R.E. *Molecular Therapy* (2001) 3, 882-891.
- 25 38. Kontermann, R. E., y Muller, R. (1999). Intracellular and cell surface display of single-chain diabodies. *J. Immunol. Methods* 226: 179-188.
39. Kornbliht *et al.* (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868.
- 30 40. Paoletta *et al.* (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545-3557.
41. Lohi *et al.* (1995), *Int. J. Cancer*, 63, 442-449
- 35 42. Jacobs *et al.* (2002), *Hum. Pathol.*, 33, 29-38.
43. Matsumoto *et al.* (1999), *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 320-325.
44. Oyama *et al.* (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 10331-10334.
- 40 45. Tavian *et al.* (1994), *Int. J. Cancer*, 56, 820-825.

Lista de secuencias

- 45 <110> Philogen S.P.A.
Wuhlfard, Sarah
- <120> Inmunoconjugado de IL-12
- 50 <130> HMK/FP6827505
- <150> Documento US 61/512.190
<151> 27-07-2011
- 55 <160> 49
- <170> PatentIn versión 3.3
- 60 <210> 1
<211> 3003
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos de P40p35F8F8

ES 2 706 428 T3

<400> 1

| | |
|--|------|
| atatgggaac tgaagaaaga tgtttatgtc gtagaattgg attggtatcc ggatgccct | 60 |
| ggagaaatgg tggcctcac ctgtgacacc cctgaagaag atggtatcac ctggaccttg | 120 |
| gaccagagca gtgaggtctt aggctctggc aaaaccctga ccatccaagt caaagagttt | 180 |
| ggagatgctg gccagtacac ctgtcacaaa ggaggcgagg ttctaagcca ttcgctcctg | 240 |
| ctgcttcaca aaaaggaaga tggaatttgg tccactgata ttttaaagga ccagaaagaa | 300 |
| cccaaaaata agacctttct aagatgcgag gccaagaatt attctggacg tttcacctgc | 360 |
| tggatggctga cgacaatcag tactgatttg acattcagtg tcaaaagcag cagaggctct | 420 |
| tctgaccccc aaggggtgac gtgctggagct gctacactct ctgcagagag agtcagaggg | 480 |
| gacaacaagg agtatgagta ctcagtggag tgccaggagg acagtgcctg cccagctgct | 540 |
| gaggagagtc tgcccattga ggtcatggtg gatgccgttc acaagctcaa gtatgaaaac | 600 |
| tacaccagca gcttcttcat cagggacatc atcaaacctg acccaccxaa gaacttgag | 660 |
| ctgaagccat taaagaattc tcggcaggtg gaggtcagct gggagtacct tgacacctgg | 720 |
| agtactccac attcctactt ctccctgaca ttctgcgttc aggtccaggg caagagcaag | 780 |
| agagaaaaga aagatagagt cttcacggac aagacctcag ccacggcat ctgccgcaaa | 840 |
| aatgccagca ttagcgtgcg ggcccaggac cgctactata gctcatcttg gagcgaatgg | 900 |
| gcatctgtgc cctgcagtgg tggaggcggc tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcggg | 960 |
| tcgagaaacc tccccgtggc cactccagac ccaggaatgt tcccatgcct tcaccactcc | 1020 |
| caaaacctgc tgagggccgt cagcaacatg ctccagaagg ccagacaaac tctagaattt | 1080 |
| tacccttgca cttctgaaga gattgatcat gaagatatca caaaagataa aaccagcaca | 1140 |
| gtggaggcct gtttaccatt ggaattaacc aagaatgaga gttgcctaaa ttccagagag | 1200 |

5

ES 2 706 428 T3

acctctttca taactaatgg gagttgacctg gcctccagaa agacctcttt tatgatggcc 1260
 ctgtgcotta gtagtattta tgaagacttg aagatgtacc aggtggagtt caagaccatg 1320
 aatgcaaagc ttctgatgga tcctaagagg cagatctttc tagatcaaaa catgctggca 1380
 gttattgatg agctgatgca ggccctgaat ttcaacagtg agactgtgcc acaaaaatcc 1440
 tccttgaag aaccggattt ttataaaact aaaatcaagc tctgcatact tcttcatgct 1500
 ttcagaattc gggcagtgac tattgataga gtgatgagct atctgaatgc ttccggtagc 1560
 gctgatggag gtgaggtgca gctggtggag tctgggggag gcttgggtaca gcctgggggg 1620
 tccttgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttta gcctgtttac gatgagctgg 1680
 gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg tagtgggtgg 1740
 agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga caattccaag 1800
 aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt atattactgt 1860
 gcgaaaagta ctcatthgta tctttttgac tactgggggc agggaaacct ggtcacctgc 1920
 tcgagtggcg gtagcggagg ggaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg 1980
 tctccagggg aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag catgccgttt 2040
 ttagcctggg accagcagaa acctggccag gctcccaggc tcctcatcta tgggtgcatcc 2100
 agcagggcca ctggcatccc agacaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact 2160
 ctcaecatca gcagactgga gcctgaagat tttgcagtgat attactgtca gcagatgcgt 2220
 ggtcggccgc cgacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaactctc ctcatccgga 2280
 agtagctctt ccggctcctc gtccagcggc gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc 2340
 ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc 2400
 ctgtttacga tgagctgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct 2460
 attagtggta gtggtggtag cacatactac gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc 2520
 tcagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac 2580
 acggccgtat attactgtgc gaaaagtact catttgtatc tttttgacta ctggggccag 2640
 ggaacctctg tcacctctc gagtggcggg agcggagggg aaattgtgtt gacgcagtct 2700
 ccaggcacc tgtctttgtc tcaggggaa agagccacc tctcctgcag ggccagtcag 2760
 agtggttagca tgccgttttt agcctggtac cagcagaaac ctggccaggc tccagggctc 2820
 ctcatctatg gtgcatccag cagggccact ggcattccag acaggttcag tggcagtggt 2880
 tctgggacag acttcaactc caccatcagc agactggagc ctgaagattt tgcagtgat 2940
 tactgtcagc agatgcgtgg tcggccggcg acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc 3000
 aaa 3003

ES 2 706 428 T3

<211> 9
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 2
 ctgtttacg 9

<210> 3
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3
 15 agtggtagtg gtggtagc 18

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 4
 agtactcatt tgatctt 18

<210> 5
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 5
 atgccgttt 9

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 ggtgcatcca gcagggccac t 21

40 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 7
 atgctgggtc ggccgccg 18

<210> 8
 <211> 1001
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de P40p35F8F8

55 <400> 8

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
 1 5 10 15

ES 2 706 428 T3

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
115 120 125

Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln
130 135 140

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
145 150 155 160

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
225 230 235 240

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
260 265 270

ES 2 706 428 T3

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
275 280 285

Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
290 295 300

Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
305 310 315 320

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

Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln
340 345 350

Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile
355 360 365

Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys
370 375 380

Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu
385 390 395 400

Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser
405 410 415

Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met
420 425 430

Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro
435 440 445

Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu
450 455 460

Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser
465 470 475 480

Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile
485 490 495

Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met
500 505 510

Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Ser Ala Asp Gly Gly Glu Val Gln Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

ES 2 706 428 T3

Leu Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
805 810 815

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
820 825 830

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
835 840 845

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
850 855 860

Tyr Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
865 870 875 880

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val
885 890 895

Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
900 905 910

Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala
915 920 925

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly
930 935 940

Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
945 950 955 960

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
965 970 975

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe
980 985 990

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
995 1000

<210> 9

<211> 3

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Leu Phe Thr

1

10

<210> 10

<211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 10
 Ala Ile Ser Gly Ser
 1 5
 <210> 11
 10 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 15 Ser Thr His Leu Tyr Leu
 1 5
 <210> 12
 <211> 3
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 Met Pro Phe
 25 1
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 35 1 5
 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 14
 Met Arg Gly Arg Pro Pro
 1 5
 45 <210> 15
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 706 428 T3

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

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

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 17

<211> 306
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 17

ES 2 706 428 T3

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
115 120 125

Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln
130 135 140

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
145 150 155 160

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
225 230 235 240

ES 2 706 428 T3

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
260 265 270

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
275 280 285

Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
290 295 300

Cys Ser
305

<210> 18

<211> 197

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

ES 2 706 428 T3

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
1 5 10 15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
20 25 30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
35 40 45

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

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser
195

5 <210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de ligador peptídico

<400> 19

ES 2 706 428 T3

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

5 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de ligador peptídico
 <400> 20

Gly Ser Ala Asp Gly Gly
 1 5

15 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de ligador peptídico
 <400> 21

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

25 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de ligador peptídico
 <400> 22

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

40 <210> 23
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 23
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc ctgtttacga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300
 catttgtatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gact 354

50 <210> 24
 <211> 324
 <212> ADN

ES 2 706 428 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc atgccgtttt tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc 300
 5 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 25

<211> 918

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

atatgggaac tgaagaaaga tgtttatgtc gtagaattgg attggtatcc ggatgccctt 60
 ggagaaatgg tggcctcac ctgtgacacc cctgaagaag atggtatcac ctggaccttg 120
 gaccagagca gtgaggtctt aggcctctggc aaaaccctga ccatccaagt caaagagttt 180
 ggagatgctg gccagtacac ctgtcacaaa ggaggcgagg ttctaagcca ttcgctcctg 240
 ctgcttcaca aaaaggaaga tggaaatttg tccactgata ttttaaagga ccagaaagaa 300
 cccaaaaata agacctttct aagatgcgag gccagaatt attctggacg tttcacctgc 360
 tgggtggctga cgacaatcag tactgatttg acattcagtg tcaaaagcag cagaggctct 420
 tctgaccccc aaggggtgac gtgcggagct gctacactct ctgcagagag agtcagaggg 480
 15 gacaacaagg agtatgagta ctcagtggag tgccaggagg acagtgcctg cccagctgct 540
 gaggagagtc tgcccattga ggtcatggtg gatgccgttc acaagctcaa gtatgaaaac 600
 tacaccagca gcttcttcat caggacatc atcaaacctg acccaccaca gaacttgacg 660
 ctgaagccat taaagaattc tcggcaggtg gaggtcagct gggagtacc tgacacctgg 720
 agtactccac attcctactt ctccctgaca ttctgcgttc aggtccaggg caagagcaag 780
 agagaaaaga aagatagagt cttcacggac aagacctcag ccacggatcat ctgccgcaaa 840
 aatgccagca ttagcgtgcg ggcccaggac cgctactata gctcatcttg gagcgaatgg 900
 gcatctgtgc cctgcagt 918

<210> 26

<211> 591

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

ES 2 706 428 T3

| | | |
|----|---|-----|
| | agaaacctcc ccgtggccac tccagaccca ggaatggtcc catgccttca ccaactccaa | 60 |
| | aacctgctga gggccgtcag caacatgctc cagaaggcca gacaaactct agaattttac | 120 |
| | ccttgcactt ctgaagagat tgatcatgaa gatatcacia aagataaac cagcacagtg | 180 |
| | gaggcctggt taccattgga attaaccaag aatgagagtt gcctaaattc cagagagacc | 240 |
| | tctttcataa ctaatgggag ttgcctggcc tccagaaaga cctcttttat gatggccctg | 300 |
| | tgccttagta gtatttatga agacttgaag atgtaccagg tggagttcaa gaccatgaat | 360 |
| | gcaaagcttc tgatggatcc taagaggcag atctttctag atcaaacat gctggcagtt | 420 |
| | attgatgagc tgatgcaggc cctgaatttc aacagtgaga ctgtgccaca aaaatcctcc | 480 |
| | cttgaagaac cggattttta taaaactaaa atcaagctct gcatacttct tcatgctttc | 540 |
| | agaattcggg cagtgactat tgatagagtg atgagctatc tgaatgcttc c | 591 |
| 5 | <210> 27 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> Secuencia sintética: secuencia de ligador | |
| | <400> 27 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcg | 45 |
| 15 | <210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> Secuencia sintética: secuencia de ligador | |
| | <400> 28 gtagcgctg atggaggt | 18 |
| 25 | <210> 29 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> Secuencia sintética: secuencia de ligador | |
| 35 | <400> 29 ggcggtagcg gaggg | 15 |
| 40 | <210> 30 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Secuencia sintética: secuencia de ligador | |
| 45 | <400> 30 tcttctcat ccggaagtag ctctccggc tcatcgtcca gcggc | 45 |
| | <210> 31 | |

ES 2 706 428 T3

<211> 1431
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de diacuerpo de cadena sencilla F8

<400> 31

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| | gaggtgcagc | tggtggagtc | tgggggaggc | ttggtacagc | ctgggggggtc | cctgagactc | 60 |
| | tcctgtgcag | cctctggatt | cacctttagc | ctgtttacga | tgagctgggt | ccgccaggct | 120 |
| | ccagggaaagg | ggctggagtg | ggtctcagct | attagtggta | gtggtggtag | cacatactac | 180 |
| | gcagactccg | tgaagggccg | gttcaccatc | tccagagaca | attccaagaa | cacgctgtat | 240 |
| | ctgcaaataga | acagcctgag | agccgaggac | acggccgtat | attactgtgc | gaaaagtact | 300 |
| | cattttgtatc | tttttgacta | ctggggccag | ggaaccctgg | tcaccgtctc | gagtgccggg | 360 |
| | agcggagggg | aaattgtgtt | gacgcagtct | ccaggcacc | tgtctttgtc | tccaggggaa | 420 |
| | agagccacc | tctcctgcag | ggccagtcag | agtgttagca | tgccgttttt | agcctggtac | 480 |
| | cagcagaaac | ctggccaggc | tcccaggctc | ctcatctatg | gtgcatccag | cagggccact | 540 |
| | ggcatcccag | acaggttcag | tggcagtggt | tctgggacag | acttactctc | caccatcagc | 600 |
| | agactggagc | ctgaagattt | tgcagtgtat | tactgtcagc | agatgcgtgg | tcggccgccg | 660 |
| | acgttcggcc | aagggaccaa | ggtggaaatc | aatcttctc | catccggaag | tagctcttcc | 720 |
| | ggctcatcgt | ccagcggcga | ggtgcagctg | ttggagtctg | ggggaggctt | ggtacagcct | 780 |
| 10 | gggggggtccc | tgagactctc | ctgtgcagcc | tctggattca | cctttagcct | gtttacgatg | 840 |
| | agctgggtcc | gccaggctcc | agggaaaggg | ctggagtggg | tctcagctat | tagtggtagt | 900 |
| | ggtggtagca | catactacgc | agactccgtg | aagggccggg | tcaccatctc | cagagacaat | 960 |
| | tccaagaaca | cgctgtatct | gcaaataaac | agcctgagag | ccgaggacac | ggccgtatat | 1020 |
| | tactgtgcga | aaagtactca | tttgtatctt | tttgactact | ggggccaggg | aaccctggtc | 1080 |
| | accgtctcga | gtggcggtag | cggaggggaa | attgtgttga | cgcagtctcc | aggcaccctg | 1140 |
| | tctttgtctc | caggggaaaag | agccaccctc | tctgtcaggg | ccagtcagag | tgtagcatg | 1200 |
| | ccgttttttag | cctggtacca | gcagaaacct | ggccaggctc | ccaggctcct | catctatggt | 1260 |
| | gcatccagca | gggccactgg | catcccagac | aggttcagtg | gcagtgggtc | tgggacagac | 1320 |
| | ttcactctca | ccatcagcag | actggagcct | gaagattttg | cagtgtatta | ctgtcagcag | 1380 |
| | atgcgtggtc | ggccgccgac | gttcggccaa | gggaccaagg | tggaaatcaa | a | 1431 |

15 <210> 32
 <211> 680
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 706 428 T3

<223> Secuencia sintética: secuencia de diacuerpo de cadena sencilla F8

<400> 32

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
 1 5 10 15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
 20 25 30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
 35 40 45

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

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
 65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
 85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
 100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
 115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
 130 135 140

5

ES 2 706 428 T3

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Ser Ala Asp Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu
195 200 205

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
210 215 220

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe Thr Met Ser Trp Val
225 230 235 240

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
245 250 255

Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
260 265 270

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
275 280 285

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Thr His
290 295 300

Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
305 310 315 320

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
340 345 350

Gln Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
355 360 365

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
370 375 380

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
385 390 395 400

ES 2 706 428 T3

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 405 410 415

Gln Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 420 425 430

Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
 435 440 445

Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 450 455 460

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
 465 470 475 480

Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 485 490 495

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 500 505 510

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 515 520 525

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 530 535 540

Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 545 550 555 560

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu
 565 570 575

Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 580 585 590

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp
 595 600 605

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
 610 615 620

Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 625 630 635 640

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 645 650 655

ES 2 706 428 T3

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly
660 665 670

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
675 680

<210> 33
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 34

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

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

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

20

ES 2 706 428 T3

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

Ser Phe Ser Met Ser
 10 1 5

<210> 36
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 20 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
 30 1 5

<210> 38
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 40 1 5 10

<210> 39
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 45 1 5

ES 2 706 428 T3

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40
 Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
 1 5
 10 <210> 41
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 41
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 115 120 125
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 130 135 140
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 145 150 155 160

ES 2 706 428 T3

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 165 170 175

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 180 185 190

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 195 200 205

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 210 215 220

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 225 230 235

5 <210> 42
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

10 Thr Val Ser Arg
 115

<210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

ES 2 706 428 T3

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

Arg Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

5 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

15 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjugado que comprende las subunidades p40 y p35 de interleucina 12 (IL-12) unidas y un diacuerpo de cadena sencilla, en el que el diacuerpo se une a fibronectina.
2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el diacuerpo de cadena sencilla está unido al extremo C-terminal de la subunidad p35.
- 10 3. Conjugado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la subunidad p40 tiene un extremo N-terminal libre.
4. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el diacuerpo de cadena sencilla se une al dominio ED-A de fibronectina.
- 15 5. Conjugado según la reivindicación 4, en el que el diacuerpo de cadena sencilla comprende un sitio de unión a antígeno que tiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 expuestas en SEQ ID NO 9-14.
- 20 6. Conjugado según la reivindicación 4, en el que el diacuerpo de cadena sencilla tiene los dominios VH y VL expuestos en SEQ ID NO 15 y 16.
7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que el diacuerpo de cadena sencilla comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 32.
- 25 8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es una proteína de fusión de cadena sencilla.
- 30 9. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método de tratamiento de cáncer o de inhibición de la angiogénesis mediante el direccionamiento de IL-12 a la neovasculatura *in vivo*.



Fig. 1a

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTQSSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT
 CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTLRCEAKNYSGRFTCWWTITDITDFTFSVK
 SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENY
 SSFFIRDIIPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGGKSKREKKDRVFTD
 KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFP
 CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFI
 TNGSCLASRKTSFMMALCLSSYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFN
 SETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGSADGGGEVQLLESGGGLVQPGGS
 LRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM
 NSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQTLTVSSGGSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ
 SVSMPFLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQMRG
 RPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSGVEQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWV
 RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYL
 FDYWGGQTLTVSSGGSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQKPGQAPRL
 LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKEIK (SEQ ID
 NO: 8)

- CDR1 VH - LFT (SEQ ID NO: 9)
- CDR2 VH - AISGS (SEQ ID NO: 10)
- CDR3 VH - STHLYL (SEQ ID NO: 11)
- CDR1 VL - MPF (SEQ ID NO: 12)
- CDR2 VL - GASSRAT (SEQ ID NO: 13)
- CDR3 VL - MRGRPP (SEQ ID NO: 14)

F8 VH –
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR
 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 15)

F8 VL –
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
 GTDFLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 16)

p40
 IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTQSSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT
 CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTLRCEAKNYSGRFTCWWTITDITDFTFSVK
 SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENY
 SSFFIRDIIPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGGKSKREKKDRVFTD
 KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 17)

p35
 RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL
 TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN
 MLVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
 (SEQ ID NO: 18)

Ligadores peptidicos

- GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19)
- GSADGG (SEQ ID NO: 20)
- GGSGG (SEQ ID NO: 21)
- SSSSGSSSSGSSSSG (SEQ ID NO: 22)

Fig. 1b

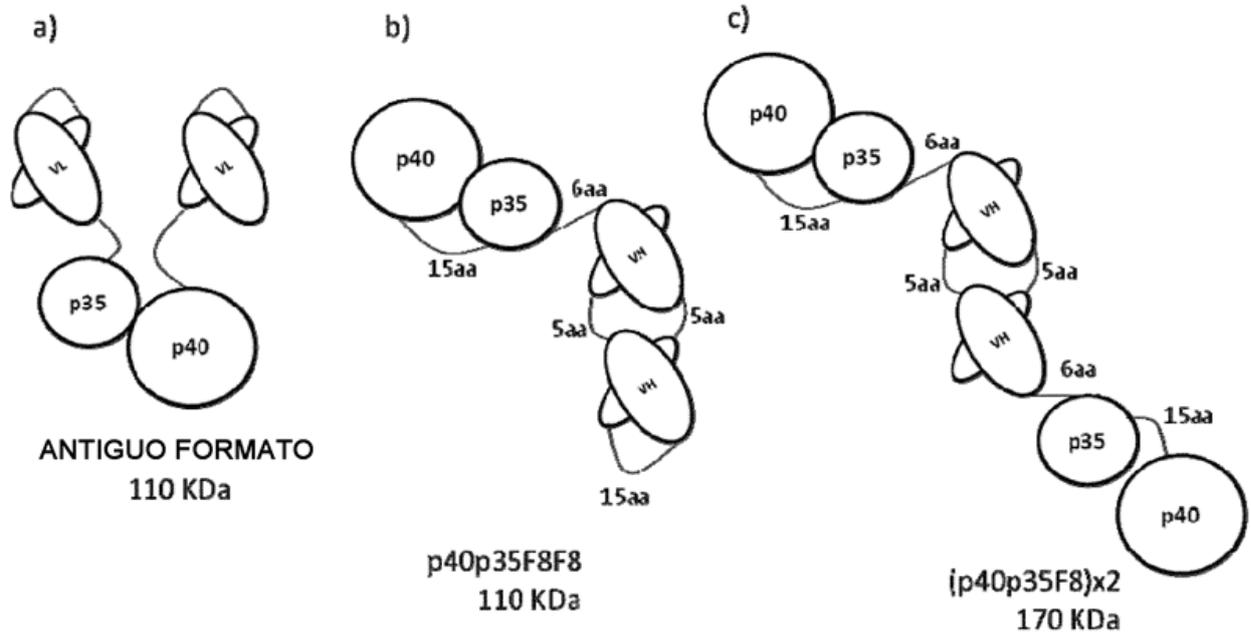


Fig. 2

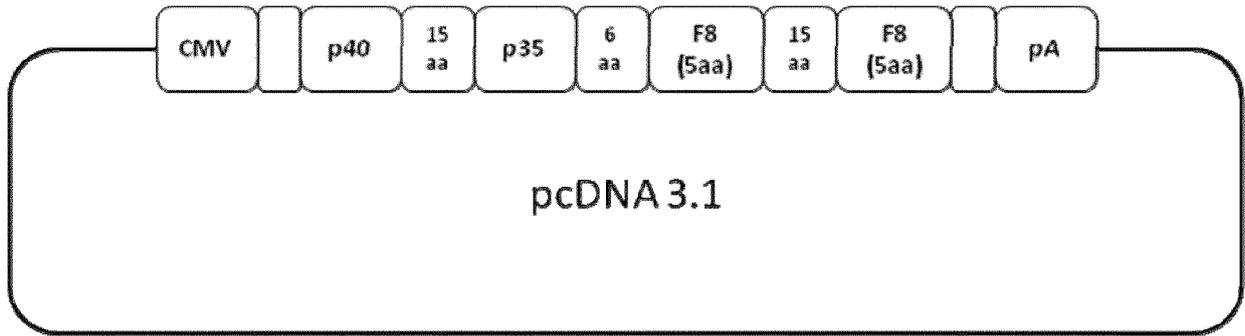


Fig. 3a

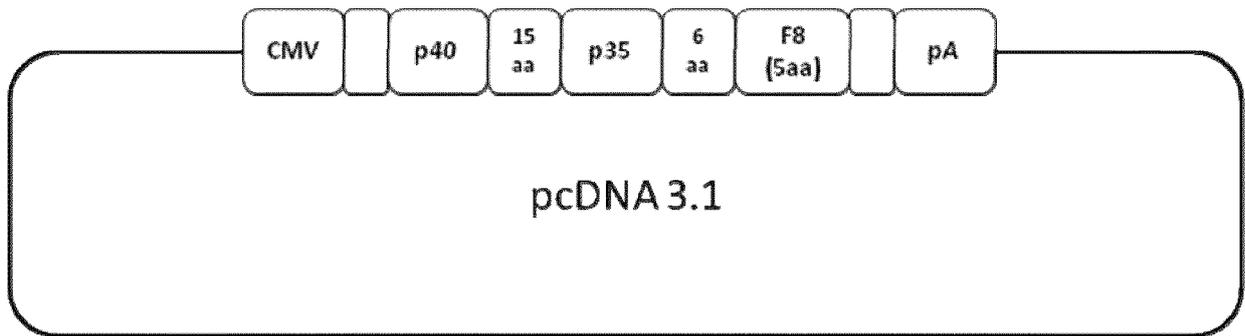


Fig. 3b

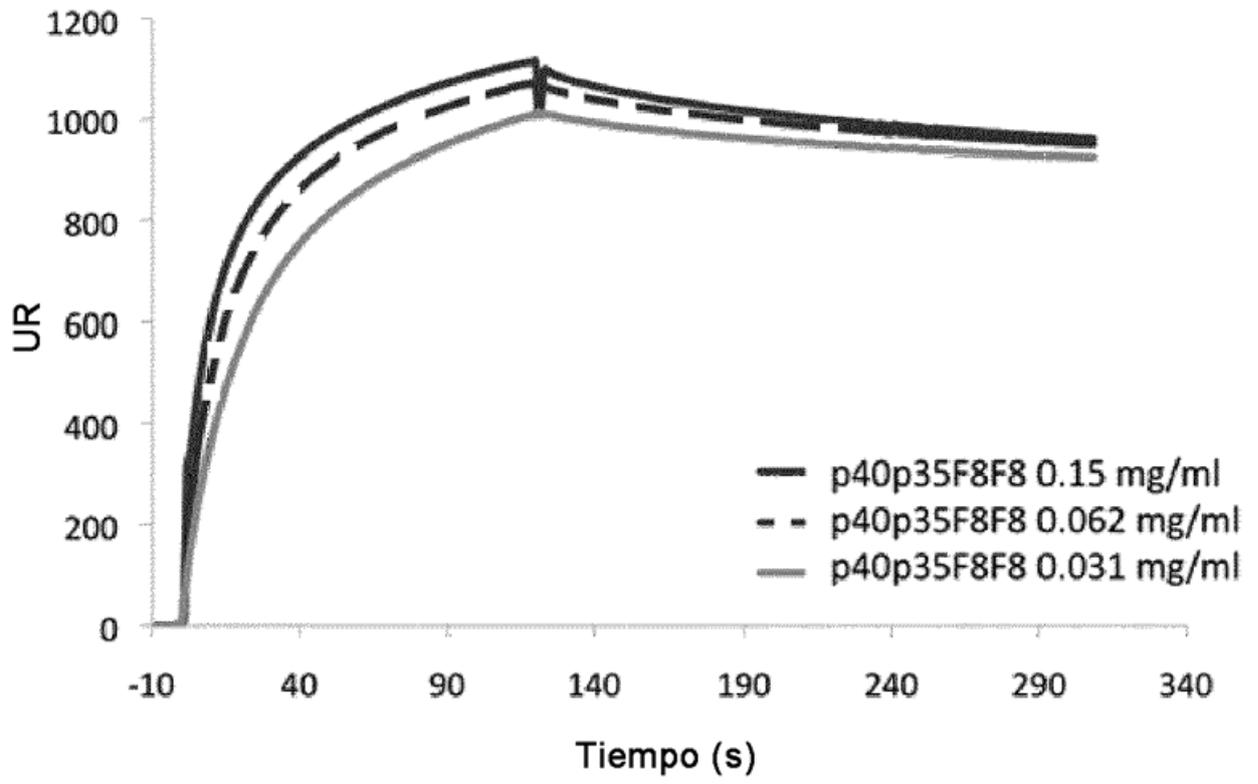


Fig. 4

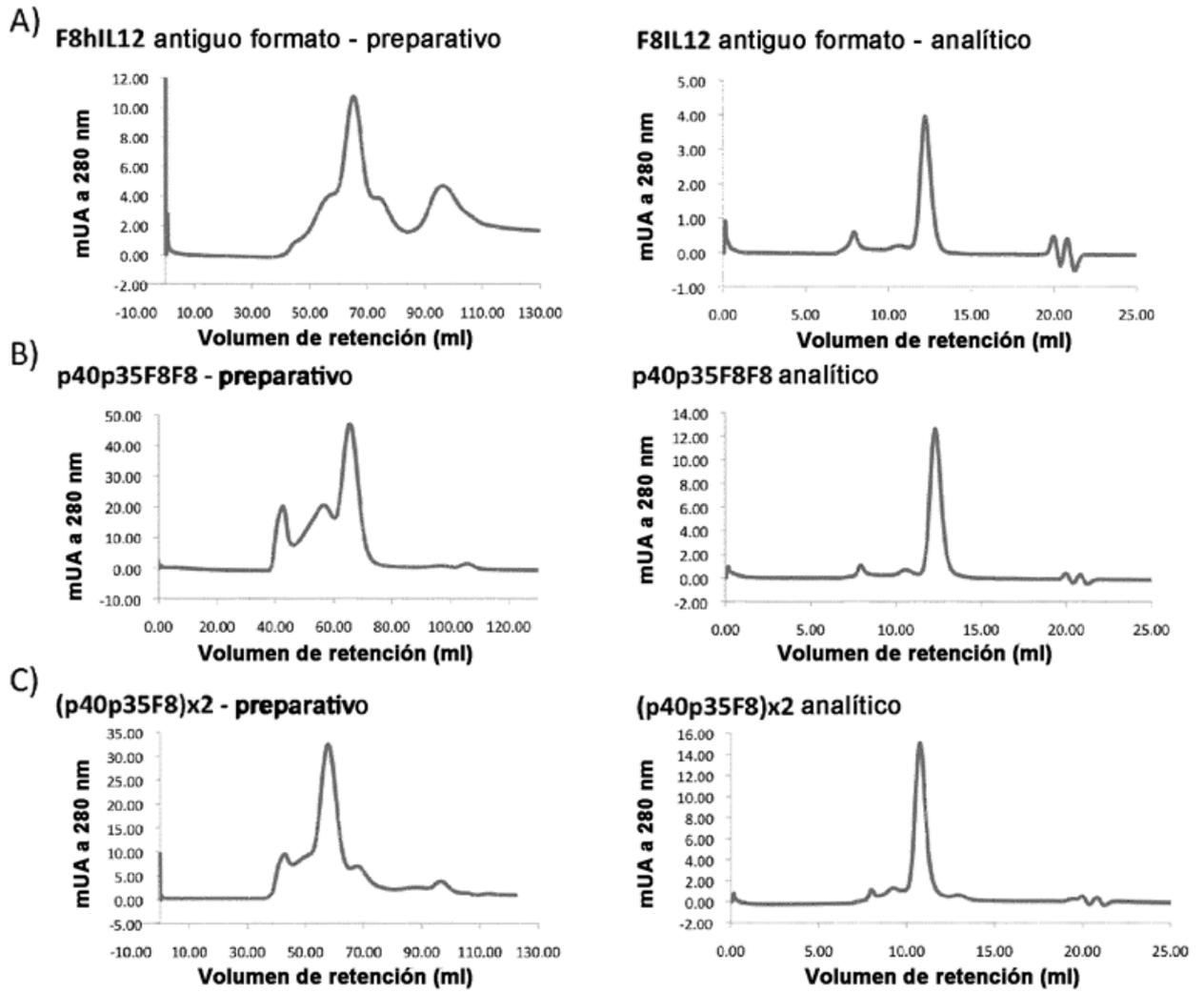


Fig. 5

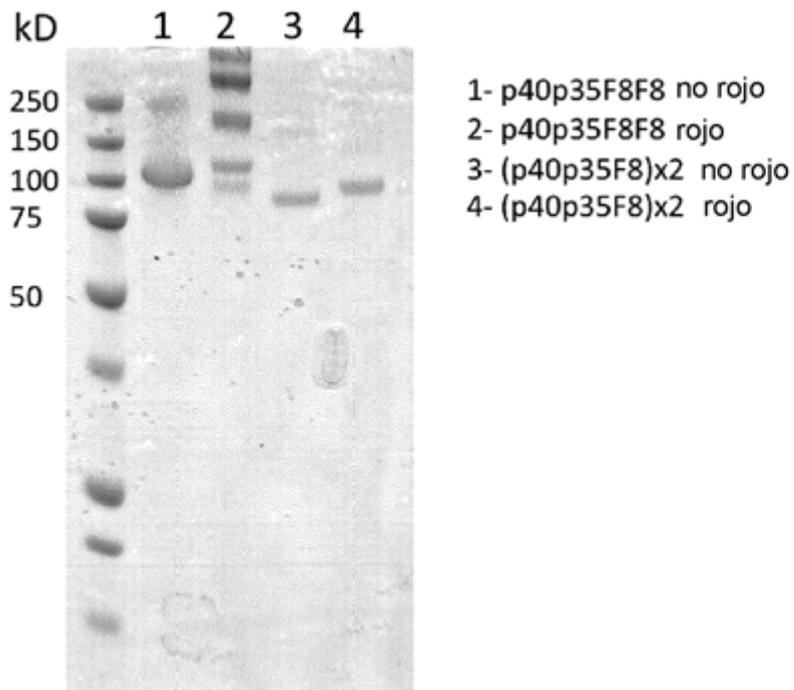


Fig. 6

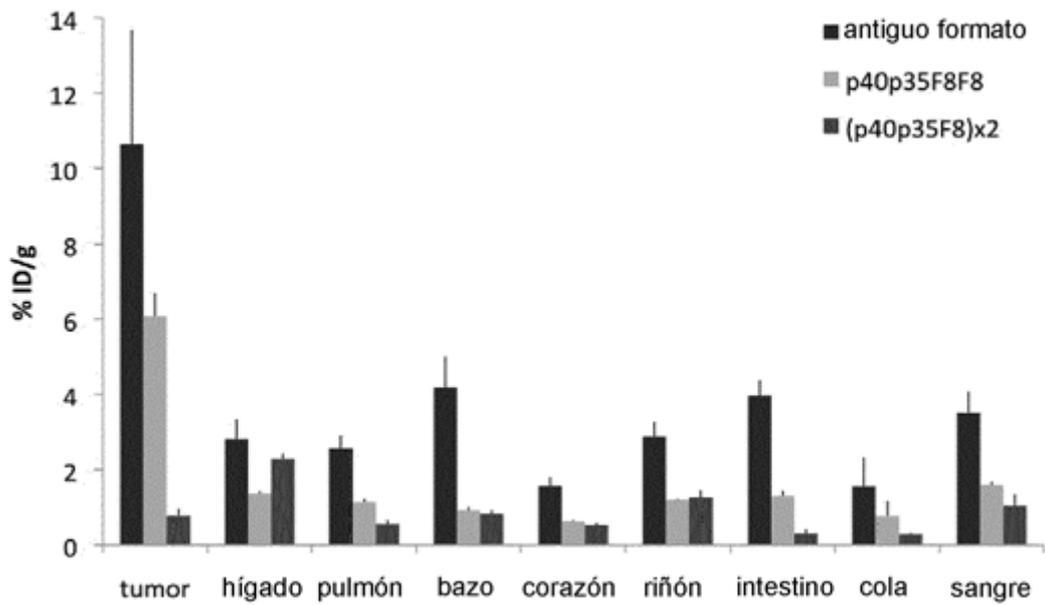


Fig. 7