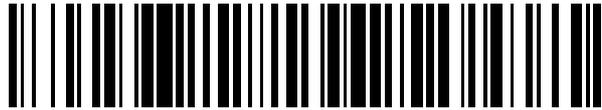


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 504**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/545 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/EP2014/064283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14735574 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3022226**

54 Título: **Miembros de la familia il-1 modificados dirigidos**

30 Prioridad:

19.07.2013 EP 13306047

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**VIB VZW (20.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE;
UNIVERSITEIT GENT (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (20.0%);
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (20.0%) y
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL
UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (20.0%)**

72 Inventor/es:

**TAVERNIER, JAN;
GERLO, SARAH;
PEELMAN, FRANK y
UZÉ, GILLES**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 714 504 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

Miembros de la familia il-1 modificados dirigidos

5 La presente invención se refiere a una IL-1 β modificada, con actividad reducida a través de su receptor de citoquina, en el que dicha IL-1 β se administra específicamente a las células diana. La IL-1 β es una mutante con afinidad reducida por el receptor de IL-1, en el que dicha IL-1 β mutante se administra específicamente a las células diana. El direccionamiento se realiza mediante la fusión de la IL-1 β modificada con un resto diana, que es un VHH o VNAR. La invención se refiere además a dicha IL-1 β modificada dirigida para uso en el tratamiento de enfermedades.

10

La familia de Interleuquinas-1 (IL-1) consiste en 11 miembros de la familia relacionados estructuralmente (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 e IL-1F5 a IL-1F10), que se encuentran entre las moléculas de señalización del sistema inmunitario más potentes, que actúan a través de un grupo de receptores estrechamente relacionados. Todos los receptores de la IL-1 tienen un modo de activación similar: tras la unión del ligando a la subunidad del receptor primario (es decir, IL-1R1 para IL-1 α y β , IL-18R para IL-18 y ST2 para IL-33), una segunda subunidad del receptor es reclutada (es decir, IL-1RAP para IL-1 α y β , IL-18RAP para IL-18 e IL-1RAP para IL-33) y la señalización se inicia mediante la yuxtaposición de los dominios del receptor citoplásmico Toll/IL-1 de las subunidades del receptor (TIR). Los dominios TIR dimerizados proporcionan una plataforma de acoplamiento para la proteína adaptadora MYD88 que, a través del reclutamiento de otros intermediarios, conduce a la activación de las rutas del factor nuclear proinflamatorio κ B (NF- κ B) y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Los miembros de la familia IL-1 son producidos principalmente por células inmunes innatas y actúan sobre una variedad de tipos de células durante la respuesta inmune (para una revisión, ver Sims y Smith, 2010).

Los linfocitos T son una de las principales células diana de la familia IL-1 y los efectos potenciadores de la IL-1 α e IL-1 β en particular en la expansión y diferenciación de diferentes subconjuntos de células T, en particular las células T CD8+ (Ben-Sasson, 2011; Ben-Sasson, 2013) y las células Th17 (Sutton et al., 2006; Acosta-Rodríguez et al., 2007; Dunne et al., 2010; Shaw et al., 2012) se han establecido firmemente. Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17 y desempeñan un papel importante en la enfermedad autoinmune y la inflamación crónica (revisado en Wilke et al., 2011). Entre los subconjuntos de linfocitos T, las células Th17 expresan los niveles más altos de IL-1R e IL-1 juega un papel importante en el cebado de Th17.

La IL-18 es mejor conocida como una citoquina que induce IFN γ con una potente acción sobre las células Th1 y las células natural killer (NK) (en Okamura et al., 1995; Takeda et al., 1998). Además, la IL-18 mejora la función de los neutrófilos (Leung et al., 2001). Varios informes demuestran la acción antitumoral de IL-18 en modelos animales (Micallef et al., 1997; Loeffler et al., 2008; Wigginton et al., 2002; Zaki et al., 2010) y la terapia con IL-18 humana recombinante recientemente ingresaron en ensayos clínicos para evaluar su eficacia para el tratamiento del cáncer avanzado (Robertson et al., 2008). A diferencia de la IL-18, la IL-33 actúa principalmente sobre las células Th2 (Schmitz et al., 2005) y en los mastocitos (Allakhverdi et al., 2007), y recientemente se demostró que actúa sobre las células T + CD8 para dirigir las respuestas antivirales (Bonilla et al., 2012).

40

Los otros miembros de la familia de IL-1 están menos caracterizados, pero, en resumen, diferentes miembros de la familia de IL-1 tienen especificidades para distintos subconjuntos de células T u otros tipos de células y, por lo tanto, diferentes aplicaciones terapéuticas.

45 Además de tener actividad antitumoral indirecta, a través de la activación de células T y NK, se demostró que los miembros de la familia IL-1 tienen propiedades citostáticas directas, que se demostraron de manera más convincente en células de melanoma humano (Morinaga et al., 1990; Usui et al., 1991; Rangnekar et al., 1992).

En vista de la contribución de varios miembros de la familia de IL-1 a los procesos inflamatorios, el interés clínico se ha orientado principalmente hacia el desarrollo de estrategias de antagonización de IL-1 (Dinarello et al., 2012). La actividad de IL-1 agonista controlada puede tener por tanto aplicaciones en diferentes procesos fisiológicos/patológicos, donde los efectos inmunoestimuladores serían deseables. Sin embargo, una de las preocupaciones principales respecto al uso de IL-1 en los tratamientos inmunoestimuladores es la grave toxicidad cuando se administra de forma sistémica. Sin embargo, cuando la acción de IL-1 podría limitarse a una población celular seleccionada, el problema de toxicidad podría resolverse, lo que abre perspectivas terapéuticas.

Por ejemplo, aunque ha habido mucho interés en bloquear las respuestas de Th17 en vista de su papel patógeno en condiciones autoinmunes como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria del intestino (Wilke et al., 2011), la función normal de Th17 es indispensable para la inmunidad protectora contra una variedad de patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* (Khader et al., 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Ye et al., 2001) y

60

Bordetella pertussis (Higgins et al., 2006). A medida que la IL-1 β estimula la función de Th17, se ha planteado la idea de utilizar la IL-1 β como un adyuvante de células T para mejorar la respuesta a vacunas débiles (Ben-Sasson et al., 2011). Otras aplicaciones podrían ser el direccionamiento de la IL-1 β o la IL-33 a la población de células T CD8+ para mejorar las respuestas antivirales o dirigir la IL-18 a células Th1 o células NK para promover la actividad antitumoral.

5

Los documentos WO 2011/029870, WO 2010/036918, US 5.914.254, WO 2011/020783, WO 2009/003145, y Rovero et al. (Gene Therapy 2001, 8:447-452) describe diferentes constructos de fusión de IL-1 β .

Sorprendentemente, encontramos que es posible diseñar modificaciones de la familia de IL-1 que son defectuosas en la activación de su receptor, pero, cuando se fusionan con un resto dirigido, recuperan su actividad en tipos celulares seleccionados mediante un efecto de concentración en la superficie celular. Las mutantes de IL-1 tienen una afinidad reducida por sus receptores cognados y, por lo tanto, son incapaces de unir y activar eficientemente sus receptores. Sin embargo, al fusionarlos con un resto dirigido (como un nanocuerpo), la actividad del miembro de la familia IL-1 mutante se restaura en las células que expresan el objetivo de la superficie celular, reconocido por el resto dirigido.

10

15 Debido a que la activación se limita sólo a los tipos de células seleccionadas, no se produce ninguna toxicidad sistémica importante.

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

20 Un primer aspecto de la invención es una composición que comprende un constructo de direccionamiento, que comprende una IL-1 β modificada, caracterizada por una afinidad reducida por su receptor de citoquina, y un resto de direccionamiento. Una IL-1 β modificada significa que la IL-1 β se ha cambiado para alterar la afinidad a su receptor, con el resultado final de que la IL-1 β modificada tiene una afinidad reducida por el receptor y una consiguiente actividad biológica reducida, en comparación con la citoquina de tipo salvaje endógena que se une normalmente al receptor.

25 Una afinidad reducida y una actividad biológica reducida consecuente como se usa aquí significa que la citoquina de la familia IL-1 modificada tiene una actividad biológica de menos del 70 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, incluso más preferiblemente menos del 60 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, más preferiblemente menos del 50 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, más preferiblemente menos del 40 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, más preferiblemente menos del 30 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, más preferiblemente menos del 20 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, más preferiblemente menos del 10 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1, lo más preferiblemente menos del 1 % de la actividad biológica de la citoquina de la familia IL-1 en comparación con la citoquina de la familia IL-1 que normalmente se une al receptor. Preferiblemente, la citoquina de la familia de IL-1 modificada es una mutante de la citoquina de la familia de IL-1 de tipo salvaje y la actividad se compara con la citoquina de la familia de IL-1 de tipo salvaje. La afinidad y/o la actividad pueden medirse por cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica.

30

35

Una realización preferida de la invención es un constructo de direccionamiento, que comprende una IL-1 β mutante caracterizada por una afinidad reducida por el receptor de interleuquina-1 de tipo I (IL-1RI) y/o el receptor de la proteína accesoria del receptor de interleuquina-1 (IL-1RAcP), y un resto de direccionamiento. La afinidad de la IL-1 β mutante por el receptor, en comparación con la afinidad de la IL-1 β de tipo salvaje por el receptor, se puede medir mediante el análisis de trazado de Scatchard y el ajuste por computadora de los datos de unión (por ejemplo, Scatchard, 1949) o por espectroscopia de interferencia reflectométrica en condiciones de flujo, según lo descrito por Brecht et al. (1993). La actividad de la IL-1 β mutante se mide típicamente usando un bioensayo (por ejemplo, mediante la inducción de la muerte celular) o midiendo los eventos de señalización corriente abajo del receptor. Dichos eventos de señalización pueden ser la modificación o la translocación nuclear de NF- κ B, o la inducción de un gen informante seleccionado. Preferiblemente, dicha IL-1 β mutante tiene una actividad biológica de menos del 70 % de la actividad biológica de la IL-1 β de tipo salvaje, incluso más preferiblemente menos del 60 % de la actividad biológica de la IL-1 β de tipo salvaje, más preferiblemente menos del 50 % de la actividad biológica de la IL-1 β de tipo salvaje, más preferiblemente menos del 40 % de la actividad biológica de la IL-1 β de tipo salvaje, más preferiblemente menos del 30 % de la actividad biológica de la IL-1 β de tipo salvaje, más preferiblemente menos del 20 % de la actividad biológica de la IL-1 β de tipo salvaje, más preferiblemente menos del 10 % de la actividad biológica del tipo salvaje, más preferiblemente menos del 1 % del tipo salvaje del cual se deduce (es decir, la IL-1 β de tipo salvaje de la cual la secuencia codificante ha sido mutada para obtener la IL-1 β mutante). Dicha mutante comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en R120X, Q131G, L145G, H146X, Q148X, F162A, K208E (en donde X puede ser cualquier cambio en el aminoácido, preferiblemente un cambio no conservativo). Incluso más preferiblemente, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en R120A, R120G, H146A, H146G, H146E, H146N, H146R, Q148E, Q148G y Q148L. Más preferiblemente, dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en R120G, H146N, H146R, Q148E y Q148G. (base de numeración en la secuencia de IL-1 β humana, número de acceso a Genbank NP_000567, versión NP_000567.1, GI:10835145).

40

45

50

55

60

Preferiblemente, dicho resto de direccionamiento está dirigido a un marcador expresado en una célula que expresa el receptor de IL-1 β , preferiblemente una célula que expresa IL1-RI. En una realización preferida, dicho resto dirigido se dirige a un marcador específico de tejido.

5

La IL-1 β modificada está unida a un resto de direccionamiento. "Ligado" como se usa aquí puede ser por una unión covalente, o puede ser por una unión por afinidad. Un "resto de direccionamiento" como se usa aquí es una molécula de unión que puede dirigir la proteína de fusión hacia un sitio de unión en una célula que expresa un receptor para la IL-1 β , por interacción específica entre el sitio de unión y la molécula de unión. Dicha molécula de unión es un dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH) o un dominio variable de nuevos receptores de antígeno (VNAR). Preferiblemente, dicho resto de direccionamiento consiste en una cadena polipeptídica simple y no se modifica después de la traducción. Aún más preferiblemente, dicho resto de direccionamiento es un nanocuerpo.

10

En un ejemplo no limitativo, dicho resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo biespecífico, dirigido a un sitio de unión en la célula diana para una especificidad, y a la citoquina objetivo, o a una marca fusionada a dicha citoquina para la otra especificidad. Como un ejemplo no limitante, el resto de direccionamiento puede unirse químicamente a la interleuquina-1 β mutante, o puede ser una proteína de fusión recombinante. Preferiblemente, dicho constructo de direccionamiento es una proteína de fusión recombinante. El resto dirigido se puede fusionar directamente con la IL-1 β mutante o se puede fusionar con la ayuda de un fragmento enlazador, preferiblemente un enlazador GGS. El resto de direccionamiento se puede fusionar en el extremo aminoterminal o en el extremo carboxiterminal de la IL-1 β mutada; preferiblemente, dicho resto de direccionamiento se fusiona en el extremo aminoterminal de la molécula de IL-1 β mutada. El constructo de direccionamiento puede comprender, además, otros dominios tales como, pero sin limitación, una secuencia marcadora, una secuencia señal, otra citoquina o un anticuerpo.

20

Otro aspecto de la invención es una composición de acuerdo con la invención para uso como un medicamento. Una realización preferida es una composición de acuerdo con la invención para uso en la estimulación de la respuesta inmune. De hecho, se sabe que el tratamiento con IL-1 puede inducir la expresión de antígenos en células B (Killar et al., 1989); del mismo modo, el tratamiento con IL-18 consiste en aumentar las inmunidades celular y humoral (Kinoshita et al., 2011). De manera similar, se ha demostrado que la IL-1 actúa sobre las células T para aumentar la magnitud de las respuestas inmunes in vivo (Ben-Sasson et al., 2011; Ben Sasson et al., 2013). Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención es la composición de acuerdo con la invención para uso como adyuvante en la vacunación. El constructo de direccionamiento de acuerdo con la invención es especialmente interesante a este respecto, ya que el efecto proinflamatorio de la IL-1 de tipo salvaje normal hace que la aplicación de IL-1 como tal sea imposible.

30

Otro aspecto más de la invención es una composición de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento del cáncer. De hecho, Morinaga et al., 1990, Usui et al., 1991 y Rangnekar et al., 1992 han demostrado que los miembros de la familia IL-1 tienen propiedades citostáticas directas, que se demostraron de manera más convincente en células de melanoma humano.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de las proteínas de fusión de IL-1 β -nanocuerpo

Figura 2: Dependencia de la concentración de la inducción de la actividad NF κ B por mutaciones de tipo salvaje y Q148G IL-1 Her2 mutante (A) y otras mutantes seleccionadas (B), en células transfectadas simuladas, o células transfectadas con deficiencia de señalización Her2.

45

Figura 3: Efecto de las fusiones de IL-1 Her2 nanocuerpo de tipo salvaje y mutante (Q148G, L145A/L147A, F162A/Q164E) en la translocación nuclear de NF- κ B p65 endógeno en células transfectadas simuladas, o células transfectadas con una deficiente señalización de Her2.

Figura 4: Inducción de la actividad de NF κ B por tipo salvaje y 5 mutantes de IL-1 diferentes, fusionados con un receptor de leptina anti-murino, en células que expresan el receptor de leptina murino (mLR) o no (no mLR).

50

Figura 5: La dependencia de la concentración de la inducción de la actividad NF κ B por los mutantes dobles de IL1 fusionados con el nanocuerpo Her2 en células transfectadas de forma simulada, o células transfectadas con Her2 deficiente en señalización.

55 EJEMPLOS.

Los ejemplos que caen fuera del alcance de las reivindicaciones se proporcionan sólo con fines ilustrativos.

Materiales y métodos para los ejemplos

60

Clonación de proteínas de fusión de IL-1-nanocuerpo.

El nanocuerpo 4-10 dirigido contra el receptor de leptina murino se describe en Zabeau et al. (2012) y en la patente WO 2006/053883. El nanocuerpo anti-Her2 1R59B se describe en Vaneycken et al. (2011). Ambos nanocuerpos se clonaron con una marca His C-terminal en el vector de expresión eucariótico pMET7. Una secuencia optimizada de codón que codifica la proteína IL-1 β madura, precedida por el péptido líder SigK y equipada con una marca HA N-terminal se generó a través de la síntesis génica (Invitrogen Gene Art). Para generar las proteínas de fusión de IL-1 β -nanocuerpo, la secuencia de IL-1 β se clonó 5' a la secuencia de nanocuerpos en pMet7, con un enlazador 13 x GGS que separa las fracciones de citoquina y nanocuerpo. (Fig. 1)

10

IL-1 β mutantes.

Se seleccionaron IL-13 mutantes de las que se espera que tengan una disminución en la afinidad de unión por IL-1R según la bibliografía y el análisis de las estructuras de cristal publicadas de IL-1 β humana complejada con su receptor. 15 Se crearon mutaciones en el resto hIL-1B mediante mutagénesis dirigida a sitio (QuickChange, Stratagene) utilizando los cebadores de mutagénesis tal como se indica en la tabla I:

Tabla I: mutantes y cebadores utilizados

		Cebador delantero	Cebador trasero
1	A117G/P118G	CCGACTACGCTGGCGGCAGTGACGGGTGTCAGAACTGAACTGC	GCAGTTCAGGCTTGTGACACCCGTCACCTG CCGCCAGCGTAGTCGG
2	R120A	CTGGCGGCAGCGCCCTGTGCTAGCCTGA ACTGCACCCCTGCG	CGCAGGGTGCAGTTCAGGCTAGCGACA GGGGCGCTGCCGCCAG
3	R120G	GCGGCAGCGCCCTGTGCGAAGCTTGA GCACCCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAGGCTTCCGACAG GGGGCGCTGCCGCC
4	L122A	CGCTGGCGGCAGTGCCCTGTGAGAAAGCGC GAACTGCACCCCTGCGGGACAGC	GCTGTCCCGCAGGGTGCAGTTCGGCGCT TCTGACAGGGGCACCTGCCGCCAGCG
5	T125G/L126G	CGCCCCGTGTCAGAAGCCTGAACTGCGGGCGG CCGGACAGCCAGCAGAAAAGC	GCCTTTCTGCTGGGTGTCCCGGGCGCC GCAGTTCAGGCTTGTGACAGGGGGCG
6	R127G	AGAAGCCTGAACTGCACACTGGGGACAGC CAGCAGAAAAGCCTGGTC	GACCAGGCTTTTCTGCTGGGTGTCCCGCC AGTGTGCAGTTCAGGCTTCT
7	Q130A	CCCTGCGGGACAGCGCGCAGAAAAGCCTGG	CCAGGCTTTTCTGCGGGGTGTCCCGCA GGG
8	Q130W	CTGCACCCTGCGGGACAGCTGGCAGAAAAG CCTGGTCATGAGC	GCTCATGACCAGGCTTTTCTGCCAGCTG TCCCGCAGGGTGCAG
9	Q131G	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTC ATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTTTCCTCCCTGGCT GTCCCGCAG
10	K132A	GCACCCTGCGGGACAGCCAGCAGGCTAGCC TGGTCATGAGCGGCC	GGCCCGTTCATGACCAGGCTAGCCTGCT GGGTGTCCCGCAGGGGTGC

(continuación)

		Cebador delantero	Cebador trasero
11	S137G/ Q138Y	CAGCAGAAAAGCCTGGTCATGGGGTACCCCT ACGAGCTGAAGGCACTGC	GCAGTGCCTTCAGCTCGTAGGGGTACC CCATGACCAGGCTTTTCTGCTG
12	L145G	GCCCCACGAGCTGAAGGCAGGTCACTGCA GGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGATGACCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGC
13	H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGGCCAGTG CCTTCAGCTCG
14	H146G	CCTACGAGCTGAAGGCACTGGGTCTGCAGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGACCCAGTG
		GCCAGGACATGG	CCTTCAGCTCGTAGG
15	H146E	GCTGAAGGCACTGGAGCTGCAGGGCCAGG	CCTGGCCCTGCAGCTCCAGTGCCTTCA GC
16	H146N	AGCTGAAGGCACTGAAATCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGATTTCAGTGCCTTCAGC T
17	H146R	CTGAAGGCACTGCGTCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGACGCAGTGCCTTCAG
18	L145A/ L147A	GCGGCCCTACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGGCGCATGCGGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCCGC
19	Q148E	GGCACTGCATCTGGAGGGCCAGGACAT	ATGTCTGGCCCTCCAGATGCAGTGCC
20	Q148G	GAAGGCACTGCATCTGGGTGGCCAGGACAT GGAACAGC	GCTGTTCCATGTCTTGCCACCCAGATG CAGTGCCTTC
21	Q148L	GCACCTGCATCTGCTGGGCCAGGACATG	CATGTCCTGGCCCGCAGATGCAGTGC
22	Q148G/ Q150G	CGAGCTGAAGGCACTGCATCTGGGGGCGG GGACATGGAACAGCAGG	CCTGCTGTTCCATGTCCCCGCCCCCA GATGCAGTGCCTTCAGCTCG

(continuación)

		Cebador delantero	Cebador trasero
23	Q150G/ D151A	GCACTGCATCTGCAGGGCGGGCCATGGAA CAGCAGGTGGTTCAGC	GCTGAACACGACCTGCTGTTCCATGGCC CCGCCCTGCAGATGCAGTGC
24	M152G	GCACTGCATCTGCAGGGCCAGGACGGGAA CAGCAGGTGGTTCAGCATGAGC	GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC CCGTCCTGGCCCTGCAGATGCAGTGC
25	F162A	CATGGAACAGCAGGTGGTTCAGCATGAGC GCCGTGCAGGGCGAGGAAAGCAACGAC	GTCGTTGCTTTCCCTGCCCTGCACGGC GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC ATG
26	F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATTTGTCATTGCTTTCCCTGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
27	F166A	CCGACTTACCATGCAGGCCGTCTCCAGCGG CGGCAGCAGATCTGG	CCAGATCTGCTGCCCGCTGGAGACG GCCTGCATGGTGAAGTCGG
28	Q164E/ E167K	GCATGAGCTTCGTGGGGGCAAGAAAGCA ATGACAAGATCCCCGTGGCC	GGCCACGGGGATCTGTCATTGCTTTCC TTGCCCCCCACGAAGCTCATGC
29	N169G/ D170G	GCAGGGCAGGAAAGCGGGCAAGATCCC CGTGGCCCTAGGCCCTGAAAAGAGAAG	CTTCTCTTTCAGGCCTAGGGCCACGGG GATCTTGCCCGCCGCTTTCCCTGCCCTGC
30	I172A	GAAAGCAACGACAAGGCCCGTGGCCCTG GG	CCCAGGGCCACGGGGCCCTTGTGCTTG CTTTC
31	V174A	GCAACGACAAGATCCCCGGGCCCTGGGCC TGAAG	CTTTCAGGCCACGGGCCGGGGATCT TGTCGTTGC
32	K208E	GCAGCTGAAAAGCGTGGATCCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGAAAAACGC	GCGTTTTCCATCTTTTTCTCGGGGTAGT TCITGGGATCCACGCTTTCCAGCTGC

(continuación)

		Cebador delantero	Cebador trasero
33	K209A	CCCCAAGAAGTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAGCGCTTCGTGTTCAAC	GTTGAACACGAAGCGCTTTTCCATCTTT GCCTTGGGGTAGTCTTTGGGG
34	K209D	GCAGCTGGAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCAAGGACAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTCCATCTTGTCCTTGGGGTAG TTCTTGGGATCCACGCTTTCCAGCTGC
35	K209A/ K210A	CCCCAAGAAGTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAACGCTTCGTGTTTC	GAACACGAAGCGTTTTTCCATCGCTGCC TTGGGGTAGTCTTTGGGG
36	K219S	AAAAACGCTTCGTGTTCAACAGCATCGAGAT CAACAACAAGCTC	GAGCTTGTGTTGATCTCGATGCTGTTG AACACGAAGCGTTTTT
37	K219Q	AAAAACGCTTCGTGTTCAACAGATCGAGAT CAACAACAAG	CTTGTGTTGATCTCGATCTGGTTGAAC ACGAAGCGTTTTT
38	E221S	GCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACAAC AAGCTCGAGT	ACTCGAGCTTGTGTTGATCGAGATCTT GTTGAACACGAAGC
39	E221K	CTTCGTGTTCAACAAGATCAAGATCAACAACA AGCTCGA	TCGAGCTTGTGTTGATCTTGATCTTGTT GAACACGAAG
40	K219S/ E221S	GGAAAAACGCTTCGTCTTCAACAGCATCTCG ATCAACAACAAGCTCGAGTTTCG	CGAACTCGAGCTTGTGTTGATCGAGAT GCTGTTGAAGACGAAGCGTTTTTCC
41	E221S/ N224A	CGCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACG CCAAGCTCGAGTTTCGAG	CTCGAACTCGAGCTTGGCGTTGATCGAG ATCTTGTGAACACGAAGCG
42	N224S/ K225S	CAACAAGATCGAGATCAACAGCAGCCTCGAA TTCGAGAGCGCCCGAG	CTGGCGCTCTCGAATTCGAGGCTGCT GTTGATCTCGATCTTGTTG

(continuación)

		Cebador delantero	Cebador trasero
43	E244K	CCCCAACTGGTACATCAGTACTAGTCAGGCC AAGAATATGCCCGTGTTC	GGAACACGGGCATATCTTGGCCCTGACT AGTACTGATGTACCAGTTGGGG
44	N245Q	CAGCACTAGTCAGGCCGAGCAGATGCCCGT CTTCCTGGCGGCACC	GGTGCCGCCAGGAAGACGGGCATCTG CTCGCCTGACTAGTGCTG
45	E244K/ N245Q	CATCAGCACTAGTCAGGCCAAGCAGATGCC GTCTTCCTGGCGGCACC	GGTGCCGCCAGGAAGACGGGCATCTG CTTGGCCTGACTAGTGCTGATG
46 *	R120G/ Q131G	GCGCAGCGCCCTGTGCGAAGCTTGAAC GCACCCTGC	GCAGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGCGCTGCCCGC
47 *	R120G/ H146A	CGAGCTGAAGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG
49 *	R120G/ L145A/ L147A	GCGGCCCCACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGGCATGGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCCGC
48 *	R120G/ Q148G	GCGGCAGGCCCTGTGCGAAGCTTGAAC GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGCGCTGCCCGC
50 *	R120G/ F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTACAGCATGAGCCCGTGGA GGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTTCCTGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
51	R120G/ K208E	GCAGCTGAAAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTCCATCTTTTTCTCGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTTCAGCTGC
52 **	Q131G/ Q148G	CTGCGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTC ATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTTTCCTCCCTGGCT GTCCCCGAC

(continuación)

	Cebador delantero	Cebador trasero
53**	Q148G/ F162A/ Q164E GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGCGAGGAAAGCAATGACAAAGATCC	Cebador trasero GGATCTTGTCATTGCTTTTCCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACCGACCTG C
54**	Q148G/ K208E GCAGCTGGAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTTCCATCTTTTTCTCGGGTAGT TCTTGGGATCCACCGCTTCCAGCTGC

* Las mutantes dobles / triples se crearon utilizando R120G como plantilla.** Las mutantes dobles / triples se crearon utilizando Q148G como plantilla.

Producción de proteínas de fusión de IL-1 β .

Se produjeron proteínas de fusión de IL-1 β en células HEK293T. Para una producción en pequeña escala, se sembraron las células HEK293T en placas de 6 pocillos con 400000 células/pocillo en DMEM complementado con FCS al 10 %. Luego de 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo con medio con poco suero (DMEM/FCS al 5 %) y se transfectaron células utilizando PEI lineal. Brevemente, la mezcla de transfección de PEI se preparó combinando 1 μ g de vector de expresión con 5 μ g de PEI en 160 μ l de DMEM, se incubó durante 10 minutos a TA y se añadió a los pocillos gota a gota. Luego de 24 horas, se lavaron las células transfectadas con DMEM y se separaron en capas con 1,5 ml de OptiMem/pocillo para la producción de proteínas. Los medios acondicionados se recuperaron después de 48 horas, se filtraron a través de filtros de 0,45 micrones y se almacenaron a -20 °C; el contenido de IL-1 β se determinó por Elisa en los medios acondicionados de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems).

Ensayo del gen informante de NF- κ B.

Para evaluar la activación de IL-1R, utilizamos HEK-Blue \textregistered células de IL-1 β que expresan en forma estable la IL-1R (Invivogen) y las transfectamos en forma transitoria con un gen informante de luciferasa NF- κ B. Brevemente, HEK-Blue \textregistered las células de IL-1 β se sembraron en medio de cultivo (DMEM/FCS al 10 %) en placas de 96 pocillos (10000 células/pocillo) y se transfectaron al día siguiente utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio con las cantidades indicadas de plásmidos de expresión y 5 ng/pocillo del plásmido de gen informante 3kB-Luc (Vanden Berghe et al., 1998). 24 horas después de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo con medio de privación (DMEM) y 48 horas después de la transfección, se indujeron las células durante 6 horas con proteínas de fusión. Después de la inducción, se lisaron las células y se determinó la actividad de la luciferasa en lisados utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Promega Firefly en un luminómetro Berthold centro LB960.

25 Análisis de la translocación nuclear NF- κ B a través de microscopia confocal.

Para la formación de imágenes confocales, se sembraron 10⁵ células HEK293-T/pocillo (en una placa de 6 pocillos) sobre cubreobjetos de vidrio (Zeiss), recubiertos con poli-L-lisina (Sigma). Al día siguiente, las células se transfectaron con 200 ng/pocillo de vector vacío o plásmido de expresión HER2 Δ cyt utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio. Después de 48 horas, las células se trataron durante 30 minutos con vehículo (medio) o proteína de fusión de IL1-Her2-nanocuerpo (10 ng/ml). A continuación, las células se enjuagaron 1 vez con PBS y se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4 %. Después de tres lavados con 1xPBS, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % en 1xPBS durante 10 minutos y se bloquearon en BSA al 1 % en 1xPBS durante otros 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron luego durante 1 hora a 37 °C con anticuerpo de conejo anti-p65 (Santa Cruz C20, diluido 1:800) y anticuerpo anti-Flag de ratón (Sigma M2, 1: 2000). Después de cuatro lavados en 1x PBS, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-conejo Alexa 488 y anti-ratón Alexa 594 conjugados con fluorocromo (ambos diluidos 1:800). Después de la incubación del anticuerpo secundario, las células se lavaron cuatro veces en 1xPBS y los núcleos se tiñeron con DAPI (2 μ g/ml). Después de una etapa de lavado final en 1xPBS, los cubreobjetos se montaron utilizando galato de propilo. Las imágenes se adquirieron utilizando un objetivo NA 60x 1.35 en un microscopio confocal de barrido láser Olympus IX-81 y se analizaron con el software Fluoview 1000.

Ejemplo 1: IL-1 β -ligando y proteínas de fusión de IL-1 β -nanocuerpo.

La Fig. 1 muestra un esquema de las proteínas de fusión IL-1 β -nanocuerpo construidas con WT hIL-1 β o mutantes de hIL1 β descritos en la tabla I.

Ejemplo 2: La actividad de IL-1 β de las fusiones mutantes seleccionadas de IL-1 β -nanocuerpo se restaura en las células que expresan los objetivos de Nb.

Los mutantes de IL-1 β de tipo natural y 45 de IL-1 β (Tabla I) se fusionaron con un nanocuerpo bien caracterizado que reconoce Her2 (1R59B). Las proteínas de fusión de IL-1 β -nanocuerpo se probaron en HEK-Blue \textregistered células IL-1 β , transfectadas transitoriamente con un plásmido informante NF- κ B (5 ng/pocillo) y un plásmido de expresión de Her2 Δ cyt (deficiente en la señalización) (2 ng/pocillo). Las células se trataron durante 6 horas con fusiones de nanocuerpos IL-1 β -Her2 (respuesta a la dosis que oscila entre 0,4 y 250 ng/ml). Como se demuestra en la Fig. 2A, la fusión de nanocuerpos de IL-1 β -Q148G-Her2 mostró una capacidad reducida para activar NF- κ B en comparación con la fusión de IL1 β -Her2-nanocuerpo de tipo salvaje. Es importante destacar que el direccionamiento de la mutante Q148G a las células que expresan Her2 Δ cyt restableció su actividad y produjo una curva de dosis-respuesta para la activación de NF-KB que es perfectamente paralela a la de la IL-1 β de tipo salvaje en células transfectadas en forma simulada. También es evidente a partir de esta figura un fuerte efecto de direccionamiento para la fusión de IL-1 β

Her2-nanocuerpo de tipo salvaje. Se observaron efectos similares de "activación dirigida" para otras seis mutantes de IL-1 β (R120G, Q131G, H146A, H145A/L147A, F162A/Q164E y K208E) fusionados con el nanocuerpo Her2 (Fig. 2B).

Para obtener una prueba adicional del concepto de "activación por direccionamiento", a continuación, exploramos si
 5 pudiéramos visualizar la activación selectiva de NF- κ B en células que expresan Her2 mediante las fusiones de IL-1 β -Her2-nanocuerpo mediante microscopia confocal. Medimos la activación de NF- κ B endógeno mediante el ensayo de su translocación nuclear. Como se observa en la Fig. 3, solo la fusión de IL-1 β -Her2 nanocuerpo de tipo salvaje promovió la translocación de NF- κ B endógeno en las células que no expresan Her2. Mientras que no promovieron la translocación detectable de NF- κ B en células transfectadas de forma simulada, las tres fusiones de IL1- β -Her2
 10 nanocuerpo mutante probadas activaron la translocación nuclear de NF- κ B en células que también se tiñeron en forma positiva para Her2, lo que indica que sólo actúan sobre las células dirigidas.

Para evaluar si el concepto de "activación por orientación" también funciona utilizando un nanocuerpo a una proteína de membrana no relacionada, fusionamos WT IL-1 β y cinco de las mutantes de IL-1 β deshabilitadas (R120G, Q131G,
 15 H146A, Q148G, K209A) a un nanocuerpo previamente caracterizado que reconoce mLR (4-10). Se realizó un experimento similar al descrito para la fusión de IL-1 β -Her2 nanocuerpo (Fig. 2) utilizando HEK-Blue \textregistered células IL-1 β , transfectadas transitoriamente con un plásmido de expresión de mLR (10 ng/pocillo). En forma similar a los resultados obtenidos con las proteínas de fusión de nanocuerpo Her2, todas las fusiones de IL-1 β nanocuerpo mutantes investigadas (evaluadas a 12,5 ng/ml) mostraron una capacidad reducida, en comparación con la fusión WT,
 20 para activar NF- κ B en células que no expresan mLRs. Sin embargo, el direccionamiento por el resto de nanocuerpo mLR restableció parcialmente la actividad de las mutantes seleccionadas (Fig. 4).

Debido a que las mutantes de IL-1 β descritas anteriormente retuvieron una actividad biológica residual significativa, combinamos diferentes mutaciones para obtener mutantes dobles/triples con una actividad basal reducida. Se
 25 probaron nueve mutantes dobles/triples (véanse las mutantes 46 a 54 de la tabla I) y de estas, seis proteínas mutantes (Q131G/Q148G, Q148G/K208E, R120G/Q131G, R120G/Q131G, R120G/H146A, R120G/K208E, R120G/F162A/Q164E) no mostraron actividad residual (usando el mismo ensayo para medir NF- κ B que en la Fig. 2) en células Her2-negativas, mientras que la actividad parcialmente restaurada fue evidente en las células que sobreexpresan Her2 Δ cyt (Fig. 5).

30 Estos datos indican en conjunto que dirigirse a IL-1 β mutante parcialmente inactiva, al fusionarla con un nanocuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular, puede restaurar su actividad en las células diana de nanocuerpo, probablemente mediante la interacción forzada del receptor a través del efecto de concentración de membrana. El hecho de que la activación mediante direccionamiento puede lograrse utilizando nanocuerpos que reconocen
 35 diferentes clases de proteínas de membrana indica una amplia aplicabilidad del concepto de "activación mediante direccionamiento".

Debido a que estos datos proporcionan una prueba de concepto de la capacidad de dirigir miembros de la familia de IL-1 mutantes a tipos de células seleccionados, restaurando su actividad sólo en estas células diana, se producen
 40 nanocuerpos que permiten dirigir a miembros de la familia IL-1 a células diana de IL-1 β fisiológicamente relevantes. En vista del importante papel de los miembros de la familia IL-1 como activadores de células T y NK, los nanocuerpos están diseñados para dirigir específicamente los subconjuntos de células IL-1 a células T y NK. Más específicamente, se desarrollan nanocuerpos que se dirigen a CCR6, que se expresan predominantemente en células Th17, así como nanocuerpos que se dirigen a CD8 en células T citotóxicas y se fusionan con los miembros de la familia IL1,
 45 preferiblemente IL-1 β .

Ejemplo 3: Efecto de las fusiones de IL-1 β -nanocuerpo en la producción de IL-17 por parte de células T humanas primarias.

50 Las células T humanas primarias se aislaron a partir de capas leucocitarias. Primero, las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de linfoprep y se incubaron O/N con 0,5 ng/ml de rhIL-2 para la recuperación. A continuación, las células T se aislaron utilizando el kit de aislamiento de células pan-T (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células T se resuspendieron (1 x 10⁶/ml) en RPMI-1640 suplementado con FCS al 10 % y microperlas activadoras de CD3/CD28 (Miltenyi Biotec). A continuación, las células
 55 (100 μ l/pocillo) se colocaron en placas de 96 pocillos con fondo en U y se estimularon durante 96 horas con las concentraciones indicadas de variantes de IL-1 β . Después de 6 horas adicionales de estimulación con PMA/ionomicina (ambos a 100 nM), se recuperaron los sobrenadantes y los niveles de IL-17 se determinaron mediante Elisa (R&D Systems). Citoquinas adicionales son evaluadas a través de la tecnología Luminex.

60 Para las fusiones mutantes seleccionadas de IL-1 β -nanocuerpo (por ejemplo, con un nanocuerpo dirigido a CCR6),

se evalúa la producción de IL-17 e IFN γ específica de la célula diana mediante tinción intracelular utilizando un enfoque de citometría de flujo.

Además, para corroborar la selectividad para la población Th17, la unión a subpoblaciones de PBMC se mide mediante doble tinción usando la marca Flag y los marcadores de CD seleccionados, seguido de un análisis de citometría de flujo.

Finalmente, en un modelo clínicamente relevante in vitro de la función de las células Th17 humanas, se evalúa la actividad adyuvante de las fusiones de IL-1 β -nanocuerpo. En vista de la necesidad de vacunas más eficaces contra Bordetella pertussis (o adyuvantes para las vacunas existentes), determinamos si las proteínas de fusión seleccionadas mejoran la respuesta Th17 humana en un modelo de cocimiento de células T naífs con células dendríticas derivadas de monocitos tratados con B. pertussis (MDDC). Las MDDC humanas se aíslan de las capas leucocitarias (utilizando el kit de aislamiento de monocitos II, Miltenyi Biotec), se tratan con diferentes proporciones de B. pertussis durante 48 horas y luego se cocultivan con células T alogénicas naífs durante 12 días. Después de la reestimulación con anti-CD3/anti-CD28, los perfiles de citoquinas en sobrenadantes se determinan utilizando la tecnología Elisa/Luminex (cfr. supra).

Ejemplo 4: Efecto de las fusiones de IL-1 β -nanocuerpo en CTLs

Para evaluar si las fusiones de IL-1 β -CD8 nanocuerpo pueden mejorar específicamente la función de las células T CD8+, las PBMC humanas se aíslan mediante centrifugación de gradiente de densidad de linfoprep de capas leucocitarias y se estimulan durante 24 horas con microperlas activadoras de CD3/CD28 (Miltenyi Biotec) en combinación con fusiones de IL1 β -CD8 Nb de tipo salvaje o mutantes. El efecto de estas proteínas de fusión en la activación de células T CD8+ se evalúa realizando una tinción intracelular para NF- κ B activo (fosforilado) e IFN γ . Además, para investigar si las fusiones de IL-1 β -nanocuerpo afectan a la desgranulación de CTL, las PBMC (2 x10⁶ células/ml) se diferencian durante 48 horas en presencia de fitohemaglutinina (PHA, 1 μ g/ml) e IL-2 (100 UI/ml) en combinación con dosis crecientes de las proteínas de fusión de IL-1 β . A continuación, para inducir la desgranulación, las células se estimulan durante 3 horas con dynabeads CD3/CD28 y se analizan mediante citometría de flujo. La desgranulación se mide a través de la detección de CD107a de superficie celular, un marcador bien establecido para la actividad natural killer. En todos los análisis de citometría de flujo en los grupos de leucocitos, se incluye la tinción anti-CD8 para permitir el monitoreo de la especificidad de tipo celular de los efectos de IL-1 β -CD8 Nb.

Finalmente, para evaluar si las fusiones de IL-1 β -CD8 nanocuerpo promueven la actividad antitumoral in vivo, a los ratones C57BL/6 se les inyectan por vía subcutánea células tumorales TC1, que producen las oncoproteínas antigénicas E6 y E7 de HPV16. Este modelo se usó previamente para demostrar que la IL-1 β promueve respuestas antitumorales mediadas por células T CD8+, específicas de antígeno (Ben-Sasson, 2013). Brevemente, los ratones se inmunizan cuatro días después de la inyección del tumor con una vacuna que contiene el péptido HPV16E749-57, combinado con DOTAP y LPS, y con nuestro sin WT o fusiones IL-1 β -CD8 Nb mutantes o fusiones Nb IL-1 β -GFP. El tamaño del tumor se controla durante 18 días después de la inmunización.

Ejemplo 5: Experimentos in vivo - Efecto adyuvante de vacunas.

En una primera serie de experimentos, los ratones C57BL/6 se tratan iv/ip con diferentes dosis de fusiones de IL-1 β -nanocuerpo de tipo salvaje y mutantes e IL-1 β no fusionada, para controlar la toxicidad aguda. La sangre venosa se recolecta en diferentes momentos después del tratamiento mediante la venopunción de la cola y el perfil de citoquinas en suero se determina mediante el ensayo Luminex. Además, mediante análisis de citometría de flujo, los niveles de citoquinas intracelulares (IL-17, IFN γ) y la activación de IL-1R (según se evalúa mediante la medición de los niveles de fosfo-NF- κ B) se determinan en subconjuntos de leucocitos seleccionados.

Cuando se han establecido dosis óptimas, su actividad adyuvante se evalúa en un protocolo de vacunación murino. En resumen, los ratones C57BL/6 se inmunizan ip con la vacuna contra la tos ferina acelular (Pa). La vacuna Pa está compuesta por 5 μ g/ratón de toxina pertussis detoxificada recombinante purificada (PT9K/129G) + hemaglutinina filamentosa (FHA) (composición según Brereton et al., 2011). 24 horas después de la inmunización, IL1 β -Nb o PBS mutantes seleccionadas se administran por vía ip o iv. Los animales son reforzados después de 28 días. Un grupo de animales se sacrifica 14 días después de la segunda inmunización y los esplenocitos se aíslan y se reestiman in vitro con medio o FHA durante 3 días. Los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo (IL-17, IFN γ , IL-2, IL-10, IL-5, IL-4, etc.) se determinan mediante la tecnología Luminex. Un segundo grupo de ratones se estimuló con B. pertussis el día 14 después del refuerzo y se sacrificó 2 horas y 5 y 10 días después de la estimulación. Los pulmones se aíslan y las CFU en homogeneizados de pulmón se cuantificarán en placas de agar Bordet-Gengou. Los niveles de citoquinas en los homogeneizados de pulmón se determinan como en los sobrenadantes de esplenocitos.

Además, se toma una muestra de sangre (de la cola) antes de la inmunización y luego cada 14 días para la determinación de los niveles de IgG específicos de *B. pertussis* en suero.

5 Ejemplo 6: Efecto antitumoral directo de las fusiones de IL-1 β -nanocuerpo

Para investigar la actividad antitumoral directa de las fusiones seleccionadas de IL1-nanocuerpo, usamos células de melanoma A375 humanas, que demostraron ser altamente susceptibles a los efectos citostáticos inducidos por IL-1 (Morinaga et al., 1990). Para permitir el direccionamiento de miembros de la familia de IL-1 mutantes a las células A375, se genera un clon de A375 estable que expresa un marcador de superficie celular para el que ya están disponibles los nanocuerpos de alta afinidad (es decir, CD20). La sensibilidad de esta línea celular, en comparación con las células A375 progenitoras, al efecto antiproliferativo de la fusión de IL1-nanocuerpo mutante, se investiga in vitro utilizando el ensayo de proliferación de XTT. La actividad antitumoral in vivo de las fusiones de IL-1-nanocuerpo mutante se investiga utilizando un modelo de xenotrasplante A375. Brevemente, los ratones atímicos desnudos se inoculan por vía subcutánea con células A375 (progenitoras o que expresan un marcador de superficie para el direccionamiento) y el crecimiento del tumor se controla durante cuatro semanas en animales tratados con PBS o fusiones de IL1-nanocuerpo mutante.

Ejemplo 7: Extensión del principio a IL18: aplicación en modelos tumorales.

Para evaluar la actividad antitumoral indirecta de los miembros de la familia IL1, se realizan experimentos para abordar la eficacia de las fusiones de IL-18-nanocuerpo mutante seleccionadas utilizando el modelo de sarcoma de ratón singénico Meth A de acuerdo con el protocolo que se usó previamente para demostrar actividad antitumoral de IL-18 (Micallef et al., 1997). Las variantes de IL18 utilizadas en estos experimentos consisten en IL-18 mutantes fusionadas con nanocuerpos que se dirigen a las células inmunes con propiedades tumorocidas (es decir, CTL, células NK). Los ratones se tratan con el constructo, y se observa una reducción significativa del tumor cuando se compara con el control tratado en forma simulada.

REFERENCIAS

- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 8:942-9.
- Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. (2007) Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol.* 179:2051-4.
- Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Hu-Li J, Paul WE. (2011) IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine.* 56:122-5.
- Ben-Sasson SZ, Hogg A, Hu-Li J, Wingfield P, Chen X, Crank M, Caucheteux S, Ratner-Hurevich M, Berzofsky JA, Nir-Paz R, Paul WE. (2013) IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 210:491-502.
- Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. and Knox, J.P. (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* 281, 29321-29329.
- Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M, Pinschewer DD. (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science.* 335:984-9.
- Brecht A., Gauglitz G., Polster J. (1993). Interferometric immunoassay in a FIA-system - A sensitive and rapid approach in label-free immunosensing., *Biosens Bioelectron* 8 : 387-392.
- Breton CF, Sutton CE, Ross PJ, Iwakura Y, Pizza M, Rappuoli R, Lavelle EC, Mills KH. (2011). *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23

- pro- duction. *J Immunol.* 2011 May 15;186(10):5896-906.
- Dimitrov, D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies). *mAbs* 1, 26-28.
- 5 Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 11:633-52.
- Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P, Mills KH. (2010). Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against
10 *Bordetella pertussis*. *J Immunol.* 185:1711-9.
- Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol.* 2006 Dec 1;177(11):7980-9.
15
- Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 2007 8:369-77.
20
- Killar, L.M., Hatfield, C.A., Carding, S.R., Pan, M., Winterrowd, G.E. and Bottomly, K. (1989) In vivo administration of interleukin 1 elicits an increased Ia antigen expression on B cells through the production of interleukin 4. *Eur. J. Immunol.* 19, 2205-2210.
- 25 Kinoshita, M., Miyazaki, H., Ono, S., Inatsu, A., Nakashima, H., Tsujimoto, H., Shinomiya, N., Saitoh, D. and Seki, S. (2011). Enhancement of neutrophil function by interleukin 18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79, 2670-2680.
- Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot
30 miniproteins. *FEBS J.* 275, 2684-2690.
- Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. (2001). A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol.* 167:2879-86.
- 35 Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC. (2008). IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 15:787-94.
- Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. (1997). Interleukin 18 induces the sequential activation of
40 natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res.* ;57:4557-63.
- Morinaga Y, Hayashi H, Takeuchi A, Onozaki K. (1990). Antiproliferative effect of interleukin 1 (IL-1) on tumor cells: G0-G1 arrest of a human melanoma cell line by IL-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 173:186-92.
- 45 Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et
50 al. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 378:88-91.
- Rangnekar VV, Waheed S, Rangnekar VM. (1992). Interleukin-1-inducible tumor growth arrest is characterized by activation of cell type-specific "early" gene expression programs. *J Biol Chem.* 267:6240-8.
- 55 Robertson MJ, Kirkwood JM, Logan TF, Koch KM, Kathman S, Kirby LC, Bell WN, Thurmond LM, Weisenbach J, Dar MM. (2008). A dose-escalation study of recombinant human interleukin-18 using two different schedules of administration in patients with cancer. *Clin Cancer Res.* 14:3462-9
- Scatchard G. (1949). *Ann New York Acad Sci* 51, 660-72.
60

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 23:479-90.

5 Shaw MH, Kamada N, Kim YG, Núñez G. (2012). Microbiota-induced IL-1 α , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med*. 209:251-8.

Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. (2010). *Nat Rev Immunol*. 10:89-102.

10 Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J*. 275, 2677-2683.

Stump, M.T., Binz, H.K., Amstutz, P. (2008) DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 13, 695-701.

15

Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 203:1685-91.

20 Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity*. 8:383-90.

Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A and Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognition* 7, 9-24.

25

Usui N, Mimnaugh EG, Sinha BK. (1991). A role for the interleukin 1 receptor in the synergistic antitumor effects of human interleukin 1 alpha and etoposide against human melanoma cells. *Cancer Res*. 1991 51:769-74.

30 Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem*. 273:3285-90.

35 Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V. (2011). Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J*.

40 Wigginton JM, Lee JK, Wiltrout TA, Alvord WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wiltrout RH. (2002). Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2. *J Immunol*. 169:4467-74.

Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol*. 32:603-11.

45 Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 194:519-27.

50 Zabeau L, Verhee A, Catteuw D, Faes L, Seeuws S, Decruy T, Elewaut D, Peelman F, Tavernier J. (2012). Selection of non-competitive leptin antagonists using a random nanobody-based approach. *Biochem J*. 441:425-34.

55 Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. (2010). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW UNIVERSITEIT GENT CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2 CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER

60

<120> MIEMBROS DE LA FAMILIA IL-1 MODIFICADOS DIRIGIDOS

<130> JT/IL1/461

5 <150> EP 13306047.5
<151> 2013-07-19

<160> 108

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 44
<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 1
ccgactacgc tggcggcagt gacgggtgca gaagcctgaa ctgc 44

<210> 2
<211> 43

25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 2
ctggcggcag cgcccctgct gctagcctga actgcaccct gcg 43

<210> 3
<211> 39

35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

40 gcggcagcgc ccctgtcgga agctgaact gcaccctgc 39

<210> 4
<211> 52

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador
<400> 4
cgctggcggc agtgcccctg tcagaagcgc gaactgcacc ctgcgggaca gc 52

<210> 5

50 <211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

55 <400> 5
cgcccctgct agaagcctga actgcggcgg ccgggacagc cagcagaaaa gc 52

<210> 6
<211> 48

60 <212> ADN

ES 2 714 504 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 5 agaagcctga actgcacact gggggacagc cagcagaaaa gcctggtc 48
 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 ccctgcggga cagcgcgcag aaaagcctgg 30
 <210> 8
 15 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 8
 ctgcaccctg cgggacagct ggcagaaaag cctggatcatg agc 43
 <210> 9
 <211> 37
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 9
 ctgcgggaca gccaggggaa gagcctggtc atgagcg 37
 <210> 10
 <211> 45
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40
 <400> 10
 gcaccctgcg ggacagccag caggctagcc tggatcatgag cggcc45
 <210> 11
 45 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador
 <400> 11
 cagcagaaaa gcctggatcat ggggtacccc tacgagctga aggactgc 49
 <210> 12
 55 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador

ES 2 714 504 T3

<400> 12
gccctacga gctgaaggca ggtcatctgc agggccagga catgg 45

5 <210> 13
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Cebador

<400> 13
cgagctgaag gcactggctc ttcaggcca ggacatgg

15
<210> 14
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador
<400> 14
cctacgagct gaaggcactg ggtctgcagg gccaggacat gg 42
<210> 15

25 <211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Cebador
<400> 15
gctgaaggca ctggagctgc agggccagg 29

<210> 16
35 <211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Cebador

<400> 16
agctgaaggc actgaatctg caggccag 29

45 <210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador

<400> 17
ctgaaggcac tgcgtctgca gggccag 27

55 <210> 18
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Cebador
 gcggccccta cgagctgaag gcagcgcgatg cgcagggcca ggacatgg 48

5 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 19
 ggactgcat ctggagggcc aggacat 27

15 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 20
 25 gaaggcactg catctgggtg gccaggacat ggaacagc 38

<210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

35 <400> 21
 gcactgcatc tgctgggcca ggacatg 27

<210> 22
 <211> 47
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

45 <400> 22
 cgagctgaag gcactgcatc tggggggcgg ggacatggaa cagcagg 47

<210> 23
 50 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Cebador

<400> 23
 gcactgcatc tgcagggcgg ggccatggaa cagcaggtcg tggtcagc 48
 <210> 24
 60 <211> 54

ES 2 714 504 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Cebador

<400> 24
gcactgcatc tgcagggcca ggacggggaa cagcaggtgg tggtcagcat gagc 54

10 <210> 25
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 25
catggaacag caggtggtgt tcagcatgag cgccgtgag ggcgaggaaa gcaacgac 58

20 <210> 26
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 26
30 gcaggtcgtg tcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc 56

<210> 27
<211> 46
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 27
ccgactcac catgcaggcc gtctccagcg gcggcagcag atctgg 46

<210> 28
<211> 50
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 28
gcatgagctt cgtggggggc aaggaaagca atgacaagat ccccgaggcc 50

<210> 29
55 <211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

60

ES 2 714 504 T3

<400> 29
gcagggcgag gaaagcggcg gcaagatccc cgtggcccta ggctgaaag agaag 55

<210> 30
5 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cebador

<400> 30
gaaagcaacg acaaggcccc cgtggccctg gg 32

15 <210> 31
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 31
gcaacgaca gatccccgcg gccctgggcc tgaaag 36

25 <210> 32
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 32
35 gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccagaaaa aagatggaaa aacgc55

<210> 33
<211> 49
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

45 <400> 33
ccccagaac tacccaagg caaagatgga aaagcgcttc gtgttcaac 49

<210> 34
<211> 55
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

55 <400> 34
gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta cccaaggac aagatggaaa aacgc55

<210> 35
60 <211> 46

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 35
 cccaagaac tacccaagg cagcgatgga aaaacgcttc gtgttc46

 10 <210> 36
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 36
 aaaaacgctt cgtgttcaac agcatcgaga tacaacaac gctc 44
 20
 <210> 37
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 37
 30 aaaaacgctt cgtgttcaac cagatcgaga tacaacaac g 41

 <210> 38
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 40 <400> 38
 gcttcgtgtt caacaagatc tcgatcaaca acaagctcga gt 42

 <210> 39
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 39
 cttcgtgttc aacaagatca agatcaaca caagctcga 39
 <210> 40
 <211> 53
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 40
 60 ggaaaaacgc ttcgttctca acagatctc gatcaacaac aagctcgagt tcg 53

ES 2 714 504 T3

<210> 41
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 41
 cgcttcgtgt tcaacaagat ctgatcaac gccaaagctcg agttcgag48
 <210> 42
 10 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 42
 caacaagatc gagatcaaca gcagcctcga attcgagagc gccag 46

 <210> 43
 <211> 50
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 43
 25 ccccaactgg tacatcagta ctatgcaggc caagaatag cccgtgttc 50
 <210> 44
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 44
 cagcactagt caggccgagc agatgccctt ctctctgggc ggcacc 46
 <210> 45
 35 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Cebador

 <400> 45
 catcagcact agtcaggcca agcagatgcc cgtcttctg ggcggcacc 49

 45 <210> 46
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador

 <400> 46
 gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc 39
 55
 <210> 47
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

ES 2 714 504 T3

<220>
<223> Cebador

<400> 47
5 cgagctgaag gcactggctc ttcaggcca ggacatgg 38

<210> 48
<211> 48
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

15 <400> 48
gcgccccta cgagctgaag gcagcgcgatg cgcaggcca ggacatgg 48

<210> 49
<211> 39
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 49
gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc 39

<210> 50
30 <211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

35 <400> 50
gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc 56
<210> 51
<211> 55
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 51

45 gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc 55
<210> 52
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador

<400> 52
55 ctgcgggaca gccaggggaa gagcctggtc atgagcg 37
<210> 53
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
60 <223> Cebador

ES 2 714 504 T3

<400> 53
gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc 56
<210> 54
<211> 55
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 54
10 gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc 55

<210> 55
<211> 44
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
<400> 55
20 gcagttcagg cttctgacac cgtcactgcc gccagcgtag tcgg 44

<210> 56
<211> 43
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
30 <400> 56
cgagggtgc agttcaggct agcgacaggg gcgctgccgc cag 43

<210> 57
<211> 39
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
40
<400> 57
gcaggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc 39

<210> 58
45 <211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Cebador

<400> 58
gctgtcccgc aggggtgcagt tcgcgttct gacaggggca ctgccccag cg 52

55 <210> 59
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60 <220>

<223> Cebador

45 <400> 59
gcttttctgc tggctgtccc ggccgcccga gttcaggctt ctgacagggg cg 52

5 <210> 60
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 60
15 gaccaggctt ttctgtggc tgccccag tgtgcagttc aggcttct 48
<210> 61
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador
<400> 61
ccaggctttt ctgctgctg tcccgcaggg 30

25 <210> 62
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

30 <223> Cebador
<400> 62
gctcatgacc aggcttttct gccagctgtc ccgcagggtg cag 43
<210> 63
<211> 37

35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

40 <400> 63
cgctcatgac caggctcttc ccctggctgt cccgcag 37
<210> 64
<211> 45
<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 64
ggccgctcat gaccaggcta gcctgtggc tgccccag ggtgc 45

50 <210> 65
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

55 <223> Cebador
<400> 65
gcagtgctt cagctcgtag ggtacccca tgaccaggct ttctgctg 49

<210> 66
60 <211> 45

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 66
 ccatgtcctg gccctgcaga tgacctgcct tcagctcgta ggggc 45

 <210> 67
 10 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> Cebador

 <400> 67
 ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg 38

 20 <210> 68
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 68
 ccatgtcctg gccctgcaga cccagtgcct tcagctcgta gg 42
 30
 <210> 69
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 69
 40 cctggccctg cagctccagt gccttcagc 29

 <210> 70
 <211> 29
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 50 <400> 70
 ctggccctgc agattcagt ccttcagct 29

 <210> 71
 <211> 27
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 60

<400> 71
ctggccctgc agacgcagtg ccttcag 27

<210> 72
5 <211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

10 <400> 72
ccatgtcctg gccctgcgca tgcgctgcct tcagctcgta ggggccgc48
<210> 73
<211> 27
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

<400> 73
20 atgtcctggc cctccagatg cagtgcc 27
<210> 74
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

25 <223> Cebador

<400> 74
gctgttccat gtcttgcca cccagatgca gtccttc 38
<210> 75
30 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

35 <400> 75
catgtcctgg cccagcagat gcagtgcc 27
<210> 76
<211> 47
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

<400> 76
cctgtgttc catgtccccg cccccagat gcagtgccct cagctcg 47
45 <210> 77
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

50 <223> Cebador
<400> 77
gctgaacacg acctgctgtt ccatggcccc gccctgcaga tgcagtgcc 48
<210> 78
<211> 54

55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador

<400> 78
60 gtcctatgctg aacaccacct gctgttcccc gtcttgcccc tgcagatgca gtgc 54

ES 2 714 504 T3

<210> 79
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 79
 gtcgttgctt tcctgcct gcacggcgct catgctgaac accacctgct gttccatg 58

10 <210> 80
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 80
 ggatctgtc attgcttcc tcgccctcca cggcgctcat gctgaacacg acctgc 56
 <210> 81
 <211> 46

20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 81

25 ccagatctgc tgccgccgct ggagacggcc tgcattgtga agtcgg 46
 <210> 82
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 82
 ggccacgggg atctgtcat tgccttcctt gccccccacg aagctcatgc 50

35 <210> 83
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

40 <223> Cebador
 <400> 83
 cttctcttc aggctaggg ccacggggat ctgcccgcg ctttctcgc cctgc 55
 <210> 84
 <211> 32

45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 84

50 cccagggcca cgggggcctt gtcgttgctt tc 32
 <210> 85
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 85
 ctttcaggcc cagggccgcg gggatctgt cgttgc 36
 <210> 86

60 <211> 55

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 86
 gcgttttcc atcttttct cgggtagtt ctgggatcc acgcttcca gctgc 55
 <210> 87
 <211> 49
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 87
 15 gttgaacacg aagcgcttt ccatottgc ctgggtag ttctgggg 49
 <210> 88
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 88
 gcgttttcc atctgtcct tgggtagtt ctgggatcc acgcttcca gctgc 55
 <210> 89
 25 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30
 <400> 89
 gaacacgaag cgttttcca tcgctgcct gggtagtgc ttgggg 46
 <210> 90
 <211> 44
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 90
 40 gagctgttg ttgatctga tgctgtgaa cacgaagcgt tttt 44
 <210> 91
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 91
 ctgtgttg atctgatct ggtgaacac gaagcgttt t 41
 <210> 92
 50 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Cebador
 <400> 92
 actcgagctt gttgtgatc gagatctgt tgaacacgaa gc 42

 <210> 93
 60 <211> 39

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 93
 tcgagcttgt tgtgatctt gatctgttg aacacgaag 39

 10 <210> 94
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 94
 cgaactcgag cttgtgttg atcgagatgc tgttgaagac gaagcgtttt tcc 53
 20
 <210> 95
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 95
 30 ctcgaactcg agcttggcgt tgatcgagat cttgtgaac acgaagcg48

 <210> 96
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 40 <400> 96
 ctgggcgctc tcgaattcga ggctgctgtt gatctcgatc ttgttg 46

 <210> 97
 <211> 50
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 97
 ggaacacggg catattcttg gcctgactag tactgatgta ccagttgggg 50
 <210> 98
 <211> 46
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 98

ggtgccgccc aggaagacgg gcatctgctc ggcctgacta gtgctg 46
 <210> 99
 <211> 49
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 99
 ggtgccgccc aggaagacgg gcatctgctt ggcctgacta gtgctgatg 49
 10 <210> 100
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador

 <400> 100
 gcagggtgca gttcaagctt cgcacagggg cgctgccgc 39
 <210> 101
 20 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 101
 ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg 38
 <210> 102
 <211> 48
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 102
 ccatgtcctg gccctgcgca tgcgctgcct tcagctcgta ggggccgc48
 35
 <210> 103
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador

 <400> 103
 gcagggtgca gttcaagctt cgcacagggg cgctgccgc 39
 45 <210> 104
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador
 <400> 104
 ggatcttgc attgcttcc togccctcca cggcgctcat gctgaacacg acctgc 56
 <210> 105
 <211> 55
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 105
 60 gcgttttcc atcttttct cggggtagtt cttgggatcc acgctttcca gctgc 55

ES 2 714 504 T3

<210> 106
<211> 37
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
<400> 106
10 cgctcatgac caggctcttc ccctggctgt cccgcag 37
<210> 107
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador
<400> 107
ggatctgtc attgctttcc tcgccctcca cggcgctcat gctgaacacg acctgc
56

20 <210> 108
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

25 <223> Cebador

<400> 108
gcgttttcc atcttttct cggggtagt cttgggatcc acgctttcca gctgc 55

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un constructo de direccionamiento, que comprende:
- 5 (1) una IL-1 β mutada caracterizada por una afinidad reducida por su receptor en comparación con la IL-1 β de tipo salvaje, en donde la IL-1 β mutada comprende una o más mutaciones seleccionadas de R120X, Q131G, L145G, H146X, Q148X, F162A, y K208E, donde X es un cambio no conservador, y
- (2) un resto dirigido que comprende un dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH) o un
10 dominio variable de nuevos receptores de antígeno (VNAR).
2. La composición, de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha IL-1 β mutante comprende una o más mutaciones seleccionadas de R120G, Q131G, L145G, H146A, Q148G, F162A y K208E.
- 15 3. La composición, de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho resto de direccionamiento está dirigido a un marcador expresado en una célula que expresa IL-1 R1 y/o IL-1 RacP.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho resto de direccionamiento se dirige a un marcador específico de tejido.
- 20 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho resto de direccionamiento se dirige a Her2 o al receptor de leptina.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la IL-1 β mutada
25 comprende uno o más de:
- (i) Q131G y Q148G,
(ii) Q148G y K208E,
(iii) R120G y Q131G,
30 (iv) R120G y H146A,
(v) R120G y K208E,
(vi) R120G, F162A y Q164E,
(vii) F162A y Q164E,
(viii) Q164E y E167K, y
35 (ix) L145A y L147A.
7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar como medicamento.
- 40 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en la estimulación de la respuesta inmune.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en el tratamiento del cáncer.
- 45 10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que una célula debe ponerse en contacto con dicha composición.
11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en la que
50 la IL-1 β mutada comprende uno o más de:
- (i) Q131G y Q148G,
(ii) Q148G y K208E,
55 (iii) R120G y Q131G,
(iv) R120G y H146A,
(v) R120G y K208E,
(vi) R120G, F162A y Q164E,
(vii) F162A y Q164E,
60 (viii) Q164E y E167K, y

(ix) L145A y L147A.

12. La composición para el uso de la reivindicación 10 u 11, en la que el resto de direccionamiento comprende un dominio variable de un anticuerpo de cadena pesada de camélido (VHH) contra HER2.

5

13. La composición para el uso de la reivindicación 10 u 11, en la que el resto de direccionamiento comprende un dominio variable de un anticuerpo de cadena pesada de camélido (VHH) contra el receptor de leptina.

Figura 1

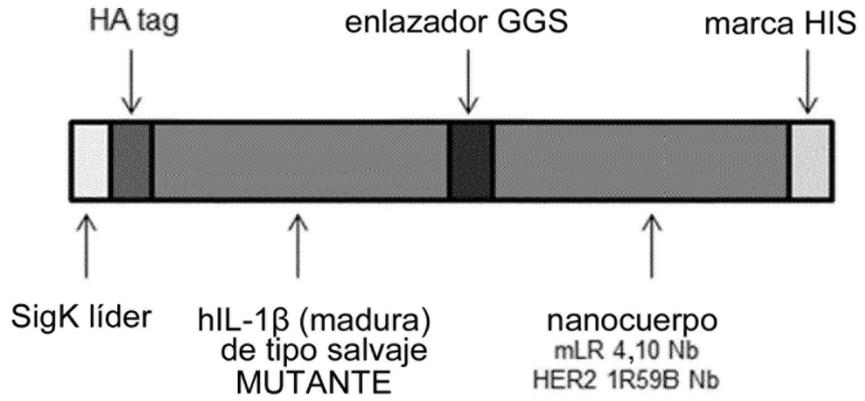


Figura 2

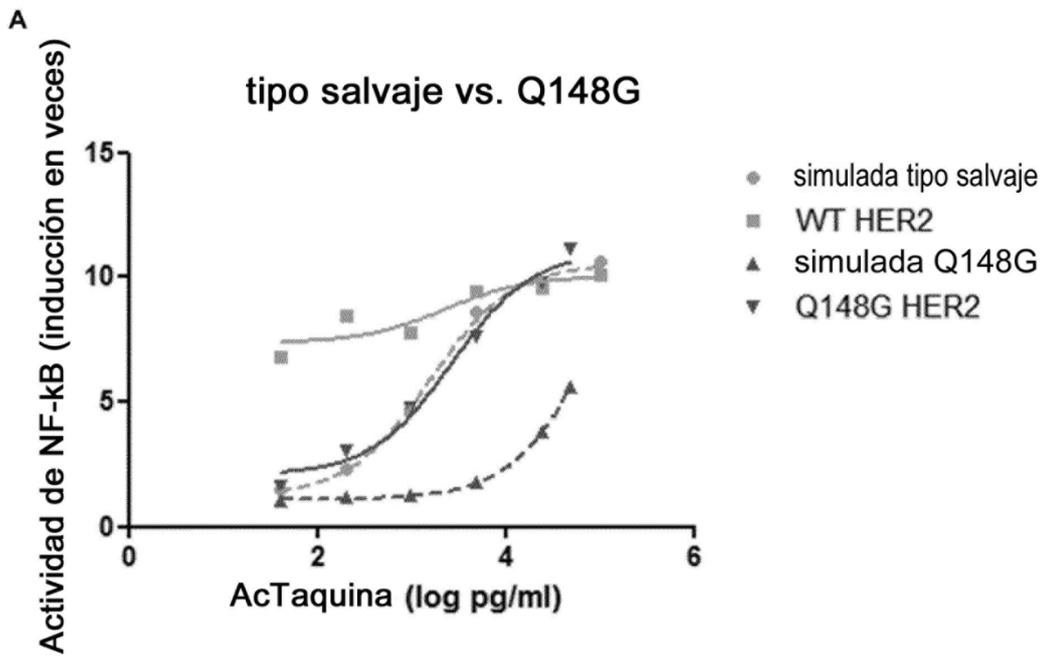


Figura 2 continuación

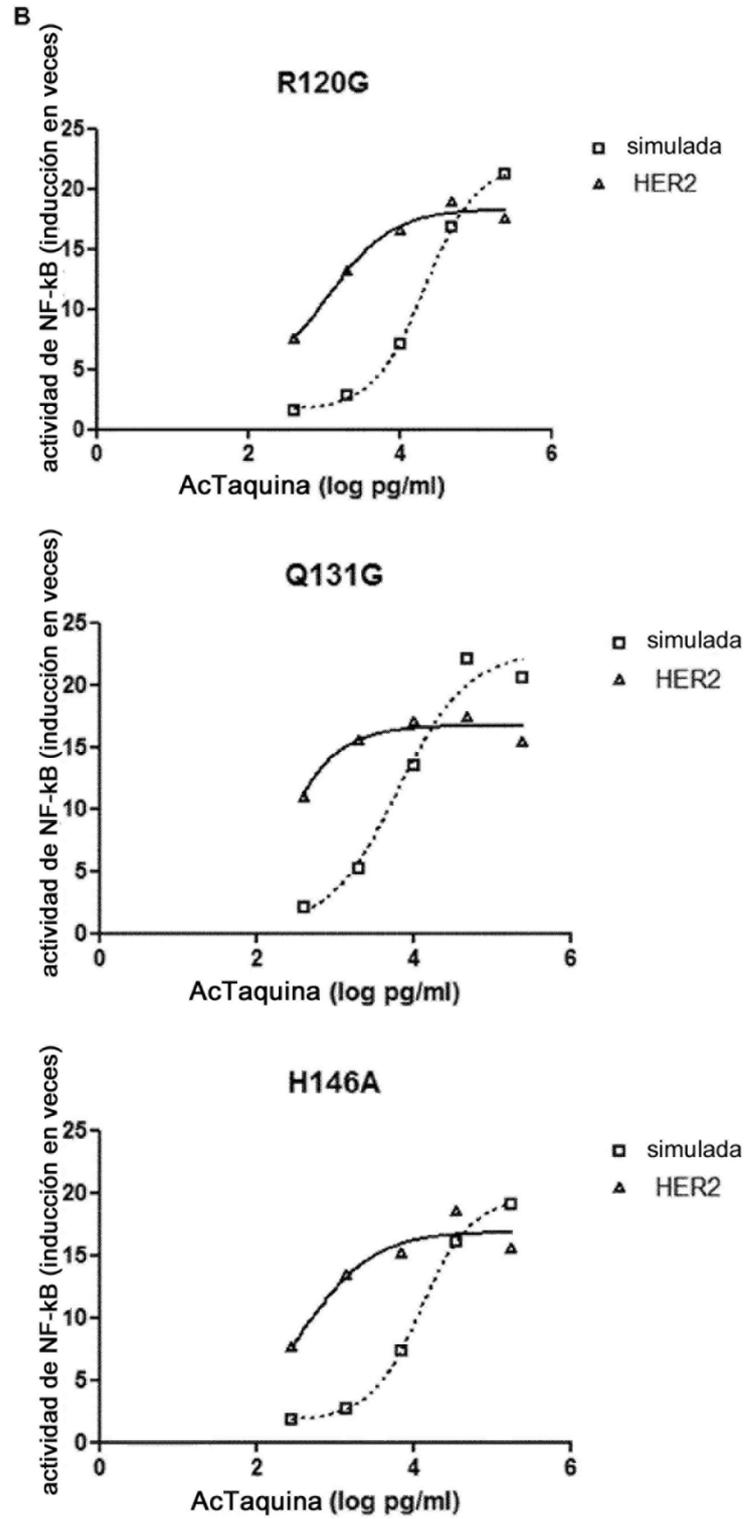


Figura 2 continuación

B

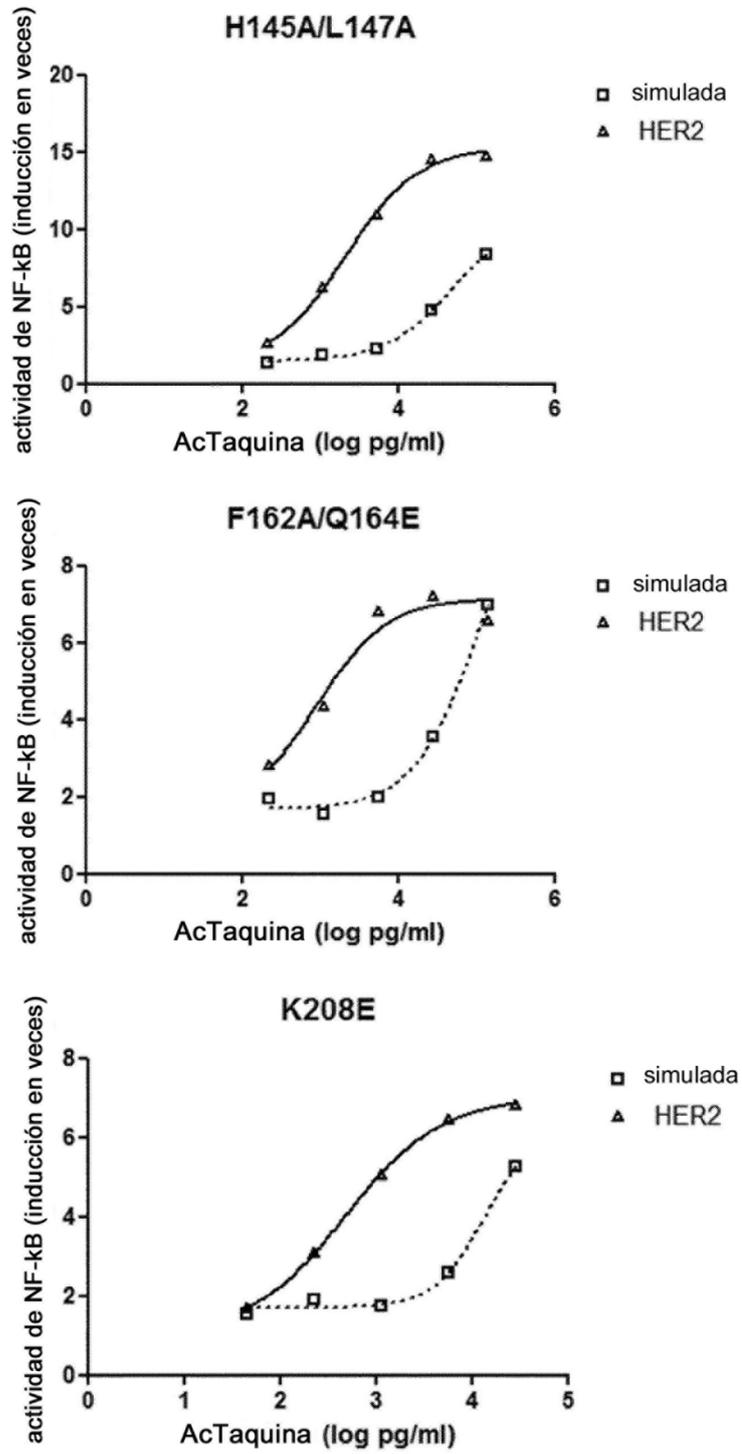


Figura 3

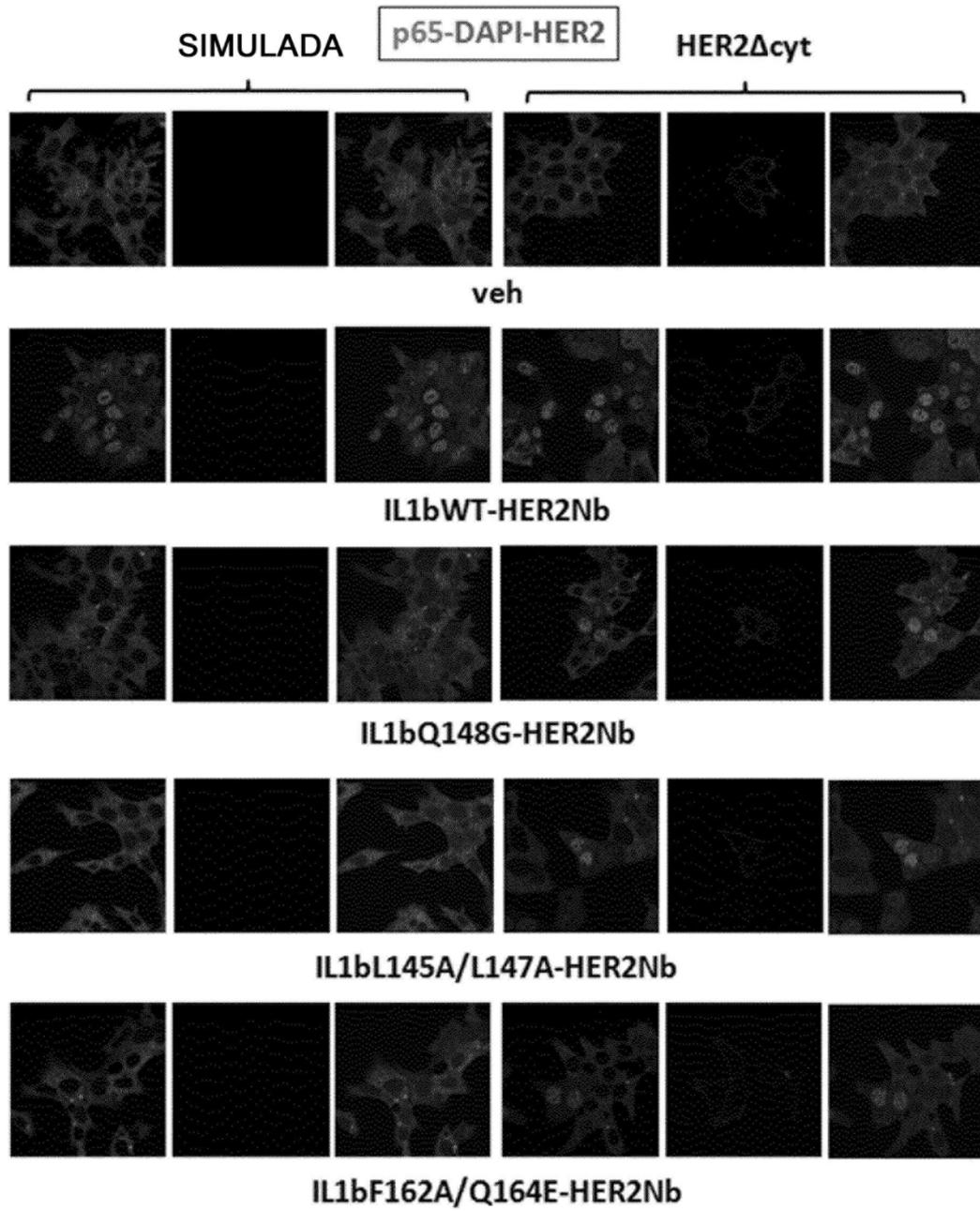


Figura 4

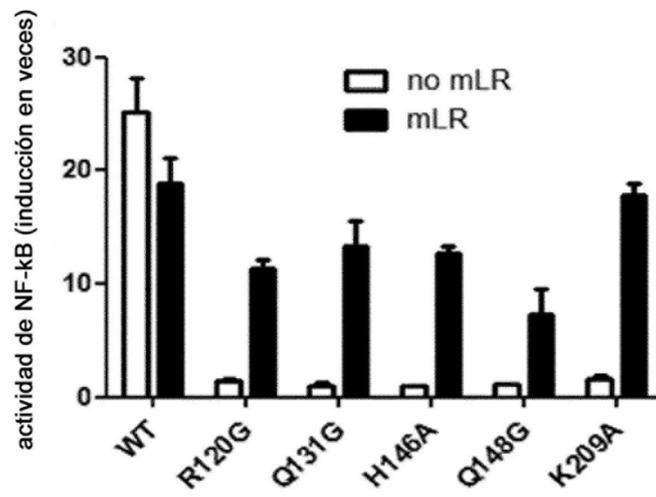


Figura 5

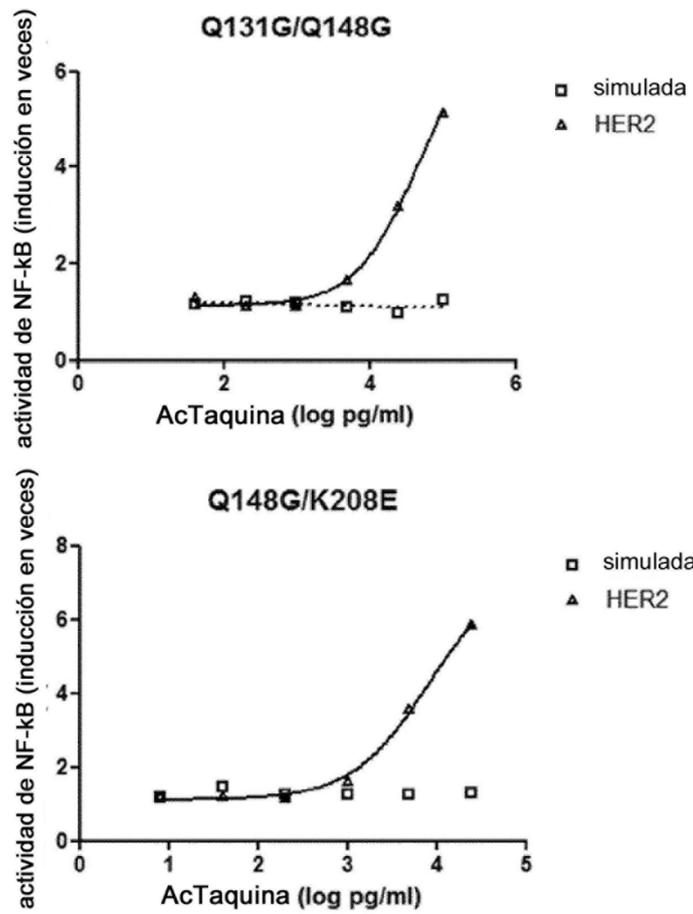


Figura 5 continuación

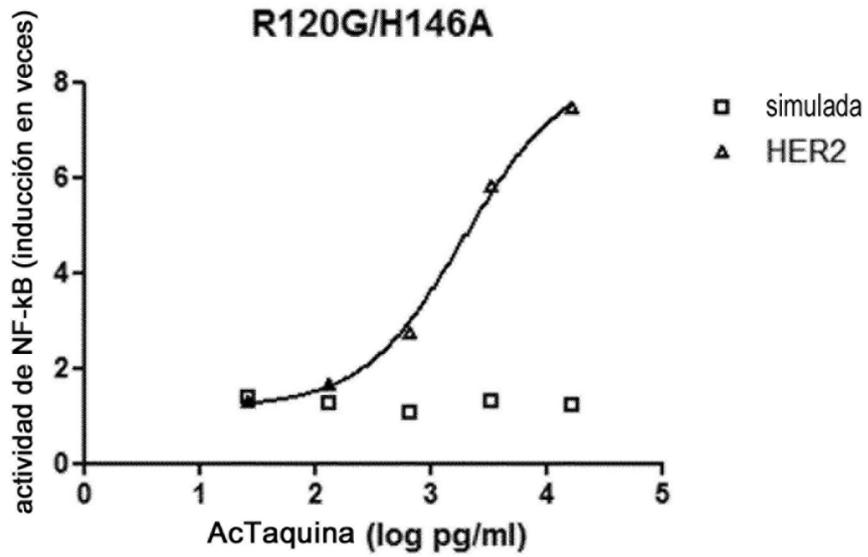
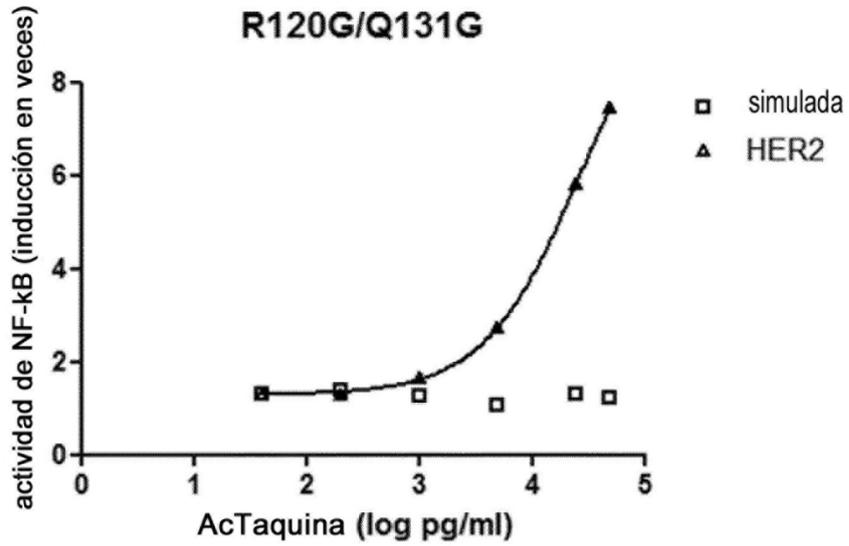


Figura 5 continuación

