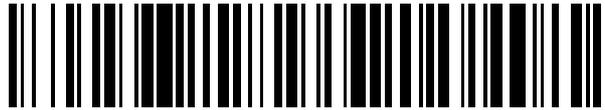


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 342**

51 Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2016 PCT/IB2016/052359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174575**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2016 E 16728097 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3288965**

54 Título: **Un receptor quimérico soluble de interleucina 10 y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

29.04.2015 IT UB20150391

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

24.02.2020

73 Titular/es:

**MEDIOLANUM FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via S.G. Cottolengo 15
20143 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**FILACI, GILBERTO;
FENOGLIO, DANIELA y
FERRERA, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 744 342 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

Un receptor quimérico soluble de interleucina 10 y su uso terapéutico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo receptor quimérico soluble de interleucina 10 (IL10) caracterizado por una baja inmunogenicidad capaz de bloquear la interacción entre la IL 10 y su receptor que se encuentra en las células del hospedador y que en particular es útil para el tratamiento de tumores así como en el tratamiento de patologías caracterizadas por altos niveles de producción de interleucina 10, tales como lupus eritematoso sistémico (LES).

10

Estado de la técnica

Los enfoques convencionales de terapia tumoral incluyen:

15

- 1) la extirpación del tumor mediante cirugía,
- 2) la destrucción del tumor mediante quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia,

Los enfoques de la inmunoterapia aplicada hasta ahora comprenden:

20

- 1) Inyecciones de anticuerpos capaces de mediar en la lisis de las células tumorales con diferentes mecanismos,
- 2) Infusiones de citocinas potencialmente capaces de activar la respuesta inmunitaria antitumoral,
- 3) Infusiones de linfocitos posiblemente capaces de destruir directamente el tumor;
- 4) Inmunización con péptidos, proteína o lisados celulares derivados de tumores.
- 5) Inmunización con genes (en forma de ADN o ARN) que codifican los antígenos asociados a los tumores (AAT).
- 6) Inhibición de las funciones inmunorreguladoras a través de agentes biológicos específicos (anticuerpos ligando anti CTLA4, anti PD1, anti PD1)

25

No obstante, las terapias convencionales dan lugar a resultados variables, en relación al tipo histológico o al estadio tumoral. En cuanto a la inmunoterapia, independiente del tipo de terapia seguida, se obtuvieron resultados insatisfactorios (20-30 % de las respuestas clínicas en diferentes protocolos clínicos, con la única excepción con respecto al uso de anticuerpos monoclonales en enfermedades específicas tales como linfoma de células B y tumor mamario).

30

En general, el arsenal terapéutico utilizado hasta ahora contra los tumores consiste principalmente en maniobras agresivas mediante el uso de agentes que tienen el propósito de destruir el cáncer, que no facilitan el proceso normal de control inmunológico que, en individuos sanos, impide la aparición o la progresión de tumores.

35

Dado que rara vez se puede lograr una eliminación completa del tumor debido a múltiples razones de naturaleza biológica, las células tumorales supervivientes permanecen en el cuerpo de la mayoría de los pacientes con tumor, a pesar de que están bajo terapia. De hecho, estas células mantienen la capacidad de evadir un sistema inmunitario aún paralizado por factores biológicos dependientes de tumores y por las terapias antitumorales mencionadas anteriormente: por lo tanto, pueden inducir una recidiva y una progresión del tumor. De hecho, incluso si los tumores tienen genes aberrantes que inducen modificaciones sustanciales desde un punto de vista morfológico, fenotípico y funcional con respecto a las células autólogas normales, estos evaden la vigilancia inmunológica. Este fenómeno es aún más sorprendente teniendo en cuenta el hecho de que los tumores expresan antígenos asociados a tumores (AAT) y que están infiltrados por linfocitos T específicos de tumor. Entre los diversos mecanismos biológicos conocidos que contribuyen a verificar la evasión inmunitaria del tumor, la actividad de los linfocitos T reguladores tiene un papel clave - secretan IL10 en el sitio del tumor. Para neutralizar el último fenómeno, sería necesario proporcionar una molécula capaz de inhibir la actividad de los linfocitos T reguladores en el sitio del tumor. La administración de dicha molécula limitaría la evasión inmunitaria del tumor y permitiría al sistema inmunitario del hospedador recuperar una reactividad antitumoral eficaz.

40

45

50

Con respecto a la terapia actual del tratamiento del lupus eritematoso sistémico, esta consiste en la administración de esteroides e inmunosupresores, fármacos que no tienen una especificidad con respecto al mecanismo de acción y además pueden causar diversos efectos secundarios graves. Una terapia más reciente permite la administración de Belimumab, un anticuerpo humano anti Blys (del inglés *B lymphocyte stimulator*, estimulador de linfocitos B), en otras palabras, un agente terapéutico capaz de inhibir la activación de los linfocitos B.

55

El LES (lupus eritematoso sistémico), junto con otras patologías autoinmunitarias, se caracteriza por una respuesta inmunitaria anómala de los linfocitos B y por una mayor secreción de IL-10 que causa una hiperproducción de autoanticuerpos con la consiguiente activación del proceso inflamatorio sistémico (Llorente et al., "In vivo production of interleukin-10 by non T-cell in rheumatoid arthritis, Síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico: a potential mechanism of B-lymphocyte hyperactivity and autoimmunity" *Arthritis Rheum*, 1994; 37: 1647-55"). cabe destacar que el tratamiento de pacientes afectados por LES con un anticuerpo monoclonal anti-IL10, tuvo efectos terapéuticos beneficiosos y favorables. (Llorente L. et al., "Clinical and biological effects of antiinterleukin 10 monoclonal antibody

60

65

administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1790-1800). Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un agente terapéutico capaz de reducir la producción de autoanticuerpos, por ejemplo a través de la neutralización de IL-10.

5 Antecedentes de la invención

La generación de la inmunoadhesina anti-IL10, es decir, una proteína de fusión constituida por la porción Fc de la inmunoglobulina (Ig) y por la cadena alfa del receptor de IL-10, se ha descrito previamente (Terai M. et al. "Human interleukin 10 receptor 1/ IgG1-Fc fusion proteins for human IL-10 with therapeutic potential" *Cancer Immunol. Immunother.* Agosto de 2009; 58(8): 1307-17 EPUB.2009 14 de enero).

Esta proteína de fusión tiene una serie de desventajas causadas por el hecho de que contiene la porción Fc de la IgG1.

De hecho, la inmunoglobulina puede causar reacciones inmunitarias/inflamatorias mediadas por el enlace del Fc con sus receptores presentes en la mayoría de las células del sistema inmunitario (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos -CCDA) o con el complemento (citotoxicidad dependiente del complemento -CDC-). Esto puede conducir a reacciones inmunitarias/inflamatorias colaterales que pueden tener repercusiones significativas en la seguridad y tolerabilidad del producto. (Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity, Margaret Ackerman y Falk Nimmerjahn, Academic Press 2014; Kapur R, Einarsdottir HK, Vidarsson G: IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly". *Immunol Lett.* Agosto de 2014; 160(2):139-44; Karsten CM, Köhl J: The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology.* Noviembre de 2012; 217(11):1067-79; Dijkstra HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG: Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* Septiembre de 2001; 22(9):510-6).

En el documento US 2009011146, en el que los inventores son algunos de los autores de la publicación anterior, se describe una proteína de fusión en la que una región constante del anticuerpo humano se fusiona con una región extracelular de la IL-10. Por regiones constantes del anticuerpo humano, se entienden regiones constantes de la IgG, en particular, seleccionadas de entre las siguientes clases;

- a) la parte Fc,
- b) una región que incluye CH2 y CH3,
- c) una región que comprende la parte de la bisagra, CH2 y CH3,
- d) una región en la que están conectados CH1-CH3,
- e) una región obtenida por delección, adición, sustitución o inserción de 1 o varios aminoácidos en una de las regiones a)-d) citadas anteriormente y que funciona como una región constante.

Además, este tipo de polipéptido de fusión puede utilizarse para enfermedades correlacionadas con IL-10. En particular, las proteínas de fusión en las que la región extracelular del receptor de IL-10 se fusiona con:

- a1) una región constante de IgG1 en la que se ha ejecutado una delección de la región bisagra, o
- a2) una región constante de IgG1, que tiene la región bisagra mutada, generada por la mutación de la cisteína en la región bisagra de tal manera que no forme un dímero (estas moléculas pueden emplearse para promover la activación de las células T citotóxicas).

Este tipo de proteínas de fusión podría utilizarse para tratar el cáncer, pero su uso está posiblemente sujeto a un alto riesgo de inducción de efectos secundarios vinculados a la presencia de una porción molecular esencialmente proinflamatoria, como el fragmento Fc o los grandes cambios CH1-CH3 contenidos en Fc (véase anteriormente). Las reacciones inmunitarias/inflamatorias colaterales y sistémicas posiblemente inducidas por dichas moléculas podrían tener repercusiones significativas en la seguridad y tolerabilidad del producto.

Objetivos de la invención

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es la generación de un inhibidor de IL-10 en particular para utilizarse como agente terapéuticamente eficaz para todos los tipos de patologías en las que la IL-10 tiene una valencia patógena y que no tiene los inconvenientes de los inhibidores de IL-10 conocidos descritos anteriormente.

El objetivo de la presente invención también es el uso de dicho inhibidor de IL-10 en el tratamiento de tumores.

Otro objeto de la presente invención es el uso de dicho inhibidor de IL-10 en el tratamiento del LES.

Otro objeto de la invención es generar un inhibidor de IL-10 que no tenga porciones moleculares posiblemente capaces de inducir fenómenos inflamatorios/inmunitarios, tales como porciones de anticuerpos o porciones de secuencias de aminoácidos no contenidas en moléculas humanas (por tanto, sustancialmente no portadoras de mutaciones o de moléculas exógenas). Esto con el fin de garantizar la tolerabilidad total de los mismos y eliminar los riesgos vinculados a la inducción de efectos secundarios.

Sumario de la invención

5 Los objetivos de la presente invención descritos anteriormente se consiguen con la generación de un receptor de proteína de fusión quimérica albúmina-IL10 capaz de antagonizar el enlace de IL-10 con el receptor natural presente en la superficie celular.

10 La presencia de albúmina dentro del polipéptido de fusión confiere estabilidad y solubilidad a esta molécula. Además, la molécula es poco inmunogénica en individuos singénicos, para evitar riesgos de desarrollar respuestas inmunitarias contra la proteína de fusión, objeto de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es la proteína de fusión mencionada anteriormente para uso como medicamento, en particular para inhibir las enfermedades de IL-10 correlacionadas.

15 Otro objeto de la presente invención es la proteína de fusión quimérica soluble albúmina-IL10 mencionada anteriormente para su uso en el tratamiento de tumores.

20 Otro objeto de la presente invención es la proteína de fusión mencionada anteriormente para su uso en el tratamiento del LES.

Otro objeto de la presente invención es una construcción polinucleotídica, preferentemente un gen, que codifica esta proteína de fusión.

25 Otro objeto de la presente invención es el gen mencionado anteriormente para su uso como medicamento, en particular para inhibir las enfermedades mediadas por IL-10.

Otro objeto de la presente invención es el gen mencionado anteriormente para su uso en el tratamiento de tumores.

30 Otro objeto adicional de la presente invención es el gen mencionado anteriormente para su uso en el tratamiento del LES.

Descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra el fenotipo y el análisis funcional de los linfocitos infiltrantes de tumores. El eje y muestra las concentraciones porcentuales individuales de cada una de las subpoblaciones de células T: CD8+, CD8+CD28+, CD8+CD28-, CD4+, CD4+CD25+ presentes en la población de linfocitos que infiltran tumores aislados de 22 pacientes. La figura también presenta las diferencias significativas entre los porcentajes promedio.

40 La Figura 2 presenta la actividad de inmunosupresión llevada a cabo por las células T CD8+CD28+, CD8+CD28- (gráfico de la izquierda) tumores infiltrantes aislados de 23 pacientes, que se sometieron a un ensayo de inhibición de proliferación de células T inducida por un anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés *monoclonal antibody*) anti-CD3. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad de proliferación inducida por CD3, medido mediante la incorporación de 3H-Timidina en las células proliferantes y realizando la lectura con un contador beta y expresada como recuentos por minuto (rpm) en los cultivos individuales. El gráfico de la derecha muestra la función inmunosupresora de los tumores infiltrantes de células T CD4+CD25+ procedentes de 5 pacientes. La inhibición de la actividad supresora por un anticuerpo monoclonal (mAb) que neutraliza la actividad biológica de IL-10, se presenta solo en el caso de los ensayos funcionales ejecutados con linfocitos TregCD8+CD28- (gráfico de la izquierda).

50 La Figura 3 muestra la inhibición de la actividad citotóxica de una línea celular de CTL específica para el péptido p540 de la telomerasa contra células T2 pulsadas con el péptido p540, en presencia o en ausencia de células T CD28+CD28-, derivadas de tumores primarios de dos pacientes. Los cultivos que contenían linfocitos T CD28+CD28- se llevaron a cabo en placas de tipo "transwell" para separar los linfocitos T CD28+CD28- de las células diana (línea tumoral T2) y de los linfocitos citotóxicos. a) CTL + células T2 no pulsadas, b) CTL+ células T2 pulsadas con el péptido p540 c) CTL+ células T2 pulsadas con el péptido p540 +CD28+CD28- d) CTL+ células T2 pulsadas con el péptido p540+ CD28+CD28- +mAb anti-IL10; e) CTL+ células T2 pulsadas con el péptido p540+CD28+CD28-+ anticuerpo de control de isotipo del mAb anti-IL10.

55 La Figura 4 muestra la actividad inmunosupresora en la proliferación de las células T ejercida por (A) gráfico de la izquierda: células T purificadas CD28+CD28- de ganglios linfáticos metastásicos de 23 pacientes o de ganglios linfáticos libres de metástasis de 6 pacientes. (B) gráfico de la derecha: células T CD24+CD25+ derivadas de ganglios linfáticos metastásicos de 6 pacientes, o de ganglios linfáticos sin metástasis de 6 pacientes.

60 Los datos se expresan como porcentaje de inhibición de la proliferación de células T inducida por un mAb anti-CD3, medido mediante la incorporación de 3H-Timidina y realizando la lectura a través de un contador beta de los recuentos por minuto (rpm) emitidos por los cocultivos.

65 La Figura 5 presenta el área promedio de lesiones de melanoma en ratones inyectados respectivamente con:  1x10⁵ células de melanoma B16 (ratones de control),  1x10⁵ células de melanoma B16 tratadas con células dendríticas (CD) pulsadas con antígeno gp100 de melanoma, inoculadas mediante inyección intramuscular (2x10⁶ CD/ratón x3 veces cada 7 días a partir del día de la administración del tumor),  1x10⁵ células de melanoma B16

tratadas con CD pulsadas con antígeno gp100, inoculadas mediante inyección intramuscular (2×10^6 células/ratón x3 veces cada 7 días e inyectadas mediante inyección subcutánea con un mA b anti-IL-10 que bloquea la actividad biológica de la citocina (150 μ g x3 veces cada 7 días a partir del día de la administración del tumor).

5 La Figura 6 presenta el análisis mediante transferencia Western del lisado de células 293T transfectadas con: pcDNA3.1 que contiene el gen que codifica la proteína de fusión murina IL10R-albúmina (carril 1), pcDNA3.1 vacío (carril 2) y lisado de células 293T no transfectadas (carril 3)

10 La Figura 7 presenta el análisis mediante transferencia Western del lisado de células 293T transfectadas con pcDNA3.1 que contiene el gen que codifica la proteína humana IL10R-albúmina (carril 1); lisado de células 293T transfectadas con pcDNA3.1 vacío (carril 2); sobrenadante de células 293T transfectadas con pcDNA3.1 que contiene el gen que codifica la proteína de fusión humana IL10R-albúmina (carril 3); sobrenadante de células 293T transfectadas con pcDNA3.1 vacío (carril 4).

La Figura 8 presenta el área promedio de las lesiones de melanoma observadas en ratones inyectados respectivamente con:

15  1×10^5 células de melanoma B16 (ratones de control),  1×10^5 células de melanoma B16 tratadas con un plásmido de control (pcDNA 3.1) que se inyectó mediante inyección intradérmica (100 μ g x3 veces cada 7 días a partir del día de la administración del tumor).

20  1×10^5 células de melanoma B16 tratadas con un plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-seroalbúmina murina (SAM) que se ha inyectado por vía intradérmica (100 μ g x3 veces cada 7 días a partir del día de administración del tumor). La figura también presenta las diferencias significativas entre los grupos.

La Figura 9 representa el área promedio de las lesiones de melanoma observadas en ratones inyectados con:

25  1×10^5 células de melanoma B16 (ratones de control),  1×10^5 células de melanoma B16 tratadas con un plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 μ g x3 veces cada 7 días a partir del día de la administración del tumor);

30  1×10^5 células de melanoma B16 tratadas con un plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 μ g x3 veces cada 7 días a partir del día de la administración del tumor) y que se inyectó por vía intradérmica con CD pulsadas con antígeno mgp100, que se inyectaron mediante inyección intramuscular (2×10^6 células/ratón x3 veces 7 días, a partir del día de la administración del tumor).

35  1×10^5 células de melanoma B16 inyectadas por vía intradérmica con CD pulsadas con antígeno mgp100, que se inyectaron mediante inyección intramuscular (2×10^6 células/ratón x3 veces cada 7 días a partir del día de la administración del tumor). La figura también presenta las diferencias significativas entre los grupos.

40 La Figura 10 presenta el área promedio de las lesiones observadas en ratones inyectados con  1×10^5 células de líneas de células tumorales vesicales singénicas MB49 (control),  1×10^5 células de líneas de células tumorales vesicales singénicas MB49 tratadas con un plásmido de control (pcDNA 3.1) que se inyectaron por vía intradérmica (100 μ g x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente a partir del día de la administración del tumor).

45  1×10^5 células tumorales vesicales singénicas MB49 tratadas con un plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 μ g x3 veces en un intervalo de 7 días entre una administración y la siguiente comenzando desde el día de administración del tumor). La figura también presenta las diferencias significativas entre los grupos.

La Figura 11 indica la detección del transgén-IL10R-SAM en ADN celular después de haberse extraído de 4×10^6 células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y de bazo, hígado y riñón de 4 ratones vacunados con ADN (pcDNA3.1IL10R-SAM) y de 1 ratón no vacunado (control), respectivamente:

50 (A) 24 horas, (B) 14 días, (C) 20 días después de la vacunación y después de la amplificación con PCR anidada de cada uno de los ADN mencionados anteriormente.

La Figura 12A presenta, en forma de gráfico explicativo, los resultados de validación presentados en la figura 12B, obtenidos realizando un ensayo ELISA en la proteína de fusión humana purificada según la presente invención; en la figura 12A el eje x presenta la concentración de IL-10 y el eje y la densidad óptica.

55 La Figura 13A presenta, en forma explicativa, los resultados de validación presentados en la Figura 13B mediante ensayos ELISA realizados en la proteína murina purificada; en la figura 13B el eje x presenta la concentración de IL-10 y el eje y la densidad óptica.

Descripción detallada de la invención

60 Para los fines de la presente invención, por proteína quimérica se entiende una proteína derivada de la fusión de secuencias peptídicas de múltiples proteínas diferentes.

Para los fines de la presente invención, por construcción polinucleotídica se entiende una secuencia de nucleótidos derivada de la fusión de múltiples genes diferentes que codifican múltiples proteínas que son diferentes entre sí.

65 En la proteína de fusión quimérica según la presente invención, la albúmina es, preferentemente, albúmina de

mamífero, más preferentemente humana y murina y aún más preferentemente humana.

La proteína de fusión albúmina - receptor de interleucina 10 según la presente invención, es un producto génico quimérico, que también se caracteriza porque la albúmina está unida al dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL-10.

El hecho de que la proteína de fusión, objeto de la invención, solo contenga el dominio extracelular (DEC) es un aspecto ventajoso ya que no contiene la porción intracitoplasmática de la cadena alfa del receptor de IL-10, es decir, una porción rica en aminoácidos hidrófobos. Por tanto, la ausencia del dominio intracitoplasmático hace que la proteína de fusión, objeto de la presente invención, sea más estable, más soluble y obtenible con un mayor rendimiento durante las etapas de producción (clonación) debido al tamaño limitado con respecto a una proteína de fusión análoga que contiene la cadena alfa completa del receptor de IL-10. Por último, la ausencia del dominio intracitoplasmático hace que la proteína sea menos inmunogénica, impidiendo así el riesgo de que el hospedador inicie una respuesta inmunitaria contra la proteína de fusión de la invención.

El receptor de la interleucina 10 (IL10R) está constituido por dos cadenas: la cadena alfa que media el enlace con la IL10 y la cadena beta que transmite la señal al interior de la célula. Dado que el objeto de la invención es bloquear la IL-10 de modo que ya no esté disponible dentro del microambiente tumoral, en la construcción quimérica solo se clonó la subunidad alfa.

La albúmina está unida al dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL-10, mediante un espaciador, y preferentemente dicho espaciador es la región bisagra de la IgG (inmunoglobulina gamma).

La IgG es preferentemente IgG1 de mamífero, más preferentemente de tipo humano y murino, aún más preferentemente proveniente de linfocitos de la sangre periférica.

La presencia de la región bisagra de la IgG, y preferentemente la IgG1, confiere flexibilidad a la porción constituida por el dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL 10, estabilizando así el enlace con su ligando relativo (IL-10) y aumentando la afinidad/avidez de esta interacción.

La proteína de fusión quimérica, albúmina-receptor de IL-10, objeto de la presente invención, para su uso como medicamento, en particular para inhibir las enfermedades correlacionadas con IL-10, pueden administrarse por vía parenteral, preferentemente por vía intravenosa, o incluso por vía tópica, preferentemente mediante administración intradérmica, administración subcutánea, etc.

Además, el gen que codifica la proteína de fusión quimérica, albúmina-receptor de interleucina 10, mencionada anteriormente, puede emplearse para su uso como medicamento en particular para inhibir las enfermedades correlacionadas con IL-10 y puede administrarse por vía parenteral, preferentemente por vía intravenosa o tópica, preferentemente mediante administración intradérmica, administración subcutánea, etc.

Cuando la proteína de fusión quimérica o el gen relativo en particular se emplean para tratar tumores, pueden administrarse por vía parenteral, incluso por vía tópica, según los métodos de administración mencionados anteriormente.

En cualquier caso, en terapia contra el cáncer, la proteína de fusión quimérica o el gen relativo pueden emplearse:

- a) Solos, para aumentar la respuesta inmunitaria contra el cáncer. Esto es aconsejable sobre todo en las fases iniciales de la enfermedad.
- b) En combinación con quimioterapia y/o radioterapia (para respaldar la respuesta inmunitaria contra el tumor durante una etapa en la que se produjeron los siguientes acontecimientos: reducción de la masa tumoral, liberación de una gran cantidad de antígenos tumorales por células moribundas y recidiva de inflamación debido a la acumulación de material necrótico).
- c) En combinación con protocolos inmunoterapéuticos para aumentar la eficacia de estos enfoques terapéuticos, con el propósito de mejorar la eficacia de las respuestas inmunitarias endógenas a través de la inhibición paralela de células reguladoras/supresoras.

En el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, la proteína de fusión quimérica albúmina-IL 10R según la presente invención, puede administrarse mediante administración intravenosa sistémica por sí sola o en combinación con los tratamientos de tipo convencional.

A continuación se presentan los siguientes ejemplos experimentales, que demuestran el papel clave de la inhibición de la interleucina 10 en la reducción de los efectos inmunosupresores de los linfocitos reguladores que se infiltran en el tumor, mediante la administración del gen que codifica la proteína de fusión según la presente invención y dicha eficacia antitumoral de la proteína *in vivo*.

EJEMPLO 1- Demostración del papel clave de la IL-10 secretada por los linfocitos infiltrantes de tumores.

Después de haber recibido el consentimiento informado de cada paciente, Se obtuvieron muestras de biopsia de un grupo de 42 pacientes afectados por cáncer de diversos orígenes, cuyas características se presentan en la siguiente tabla 1, con quienes se realizó una serie de experimentos adaptados para demostrar el papel clave de los linfocitos T reguladores infiltrantes de tumores y de la citocina IL-10 liberada de ese modo en el microambiente tumoral.

5

TABALA 1 - RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEFINICIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS DE CADA PACIENTE

Paciente N°	Cáncer	Estado clínico	Supervivencia (meses)	Lesiones tumorales primarias	Ganglio linfático metastásico*	Ganglio linfático sin metástasis *	CMSP*
1	Estómago	T4	>12	-	+	-	+
2	Páncreas	T4	>12	-	+	-	+
3	Colon-Recto	T4	<12	+	+	-	+
4	Páncreas	T4N2	<12	-	+	-	+
5	Colon-Recto	T4	>12	-	+	-	+
6	Colon-Recto	T4N1	>12	+	+	-	-
7	Estómago	T3	>12	+	+	-	+
8	Sarcoma	T4	<12	-	+	-	+
9	Riñón	T4N0	>12	-	+	+	+
10	Riñón	T1a	>12	+	+	-	+
11	Colon-Recto	T4	<12	+	+	+	+
12	Colon-Recto	T4	<12	+	+	-	+
13	Colon-Recto	T4	>12	+	-	+	+
14	Colon-Recto	T4	>12	+	-	-	+
15	Cabeza-Cuello	T4	<12	-	+	-	+
16	Tiroides	T2N2	>12	+	+	-	+
17	Colon-Recto	T4N0	-	-	+	-	+
18	Colon-Recto	T4N2	<12	+	+	-	+
19	Estómago	T2bN3	>12	+	+	-	+
20	Colon-Recto	T3N0	<12	+	-	-	+
21	Estómago	T4N3	<12	+	+	+	+
22	Colon-Recto	T4	>12	+	+	-	+
23	Hodgkin	Estadio 2	>12	-	-	+	+
24	Melanoma	T4	<12	-	+	-	+
25	Colon-Recto	T4N1	<12	+	+	-	+
26	Ovario	T1N0	>12	+	+	+	+
27	Esófago	T3N1M1	>12	+	-	-	+
28	Ovario	T3M1	<12	+	-	-	+
29	Colon-Recto	T4	<12	+	-	-	+
30	Colon-Recto	T4	<12	+	-	-	+
31	Mama	T4	-	+	-	-	+
32	Colon-Recto	T4	-	+	+	-	+
33	Pulmón	T3	-	-	+	-	-
34	Hodgkin	Estadio 2	-	-	+	-	-
35	Próstata	T3	-	-	+	+	-
36	Hodgkin	Estadio 3	-	-	+	-	-
37	Pulmón	T3	-	-	+	-	-
38	Cabeza-Cuello	T4	-	-	+	+	-

(continuación)

Paciente N°	Cáncer	Estado clínico	Supervivencia (meses)	Lesiones tumorales primarias	Ganglio linfático metastásico*	Ganglio linfático sin metástasis *	CMSP*
39	Seminoma	T1	-	-	+	-	-
40	Pulmón	T2	-	-	+	-	-
41	Carcinoma neuroendocrino	T3	-	-	+	-	-
42	No Hodgkin	Estadio 4	-	+	-	-	+

*: material biológico
 +: disponible
 -: no disponible

Ejemplo 1A: Caracterización de las poblaciones de linfocitos T reguladores infiltrantes de tumores derivados de pacientes oncológicos.

5 Se realizó un análisis fenotípico y funcional de las células infiltrantes de tumores derivadas de muestras de biopsia extraídas de 22 pacientes cuyas características se presentan en la Tabla 1. Para dicha finalidad, las muestras tumorales se fragmentaron finamente utilizando filtros estériles adecuados. Posteriormente, las suspensiones celulares obtenidas se estratificaron y se centrifugaron en gradiente de Ficoll. Por último, las diferentes subpoblaciones de linfocitos se purificaron mediante procedimientos de "clasificación" inmunomagnéticos utilizando bolas magnéticas adecuadas conjugadas con anticuerpos específicos (Miltenyi Biotech). El inmunofenotipo de los linfocitos infiltrantes ejecutado con anticuerpos monoclonales anti CD4, anti CD8, anti CD25, anti CD28 conjugados con fluorocromos (BD Biosciences) hizo posible la caracterización de dos poblaciones de linfocitos T reguladores (Treg), es decir, linfocitos Treg CD4+CD25+ y CD8+CD28- de entre los linfocitos infiltrantes de tumor, como se presenta en la Figura 1.

Ejemplo 1B Verificación de la actividad inmunosupresora de las células infiltrantes de tumor en linfocitos T.

La actividad inmunosupresora de las células T infiltrantes de tumor se midió en un ensayo de inhibición de la proliferación de linfocitos T de sangre periférica activados con anticuerpo mAb anti-CD3 y se evaluó mediante la incorporación de 3H-Timidina en las células proliferantes y la lectura se midió en un contador beta como recuentos por minuto (rpm). Los datos se expresan en la Figura 2 como porcentaje de inhibición de la proliferación de células T en presencia del mAb anti-CD3. En particular, el ensayo mostró actividad supresora de la proliferación por células T CD8+CD28-, pero no por células T infiltrantes de tumor CD8+CD28+, extraídas de 23 pacientes (Figura 2, gráfico de la izquierda) y por células T infiltrantes de tumor CD4+CD25+ procedentes de 5 pacientes (Figura 2, gráfico de la derecha). Dicha actividad supresora de los linfocitos Treg infiltrantes de tumor CD8+CD28- se bloquea en presencia del anticuerpo monoclonal mAb anti-IL10 (Figura 2, gráfico de la izquierda).

EJEMPLO 1-C Actividad inhibidora de las células T CD8+CD28- sobre la actividad citotóxica de los linfocitos T específicos de tumor.

La función reguladora de la población de células T CD8+CD28- derivada de muestras oncológicas, también se evaluó con respecto a la capacidad citotóxica de una línea celular humana de CTL específica para el péptido p540 de la telomerasa. Para dicha finalidad, la actividad citotóxica de esta línea de CTL se sometió a ensayo contra células pertenecientes a la línea tumoral linfoblástica T2 pulsada con el péptido p540 en presencia o en ausencia de células T reg CD8+CD28- aisladas de masas tumorales primarias de dos pacientes afectados por tumor de próstata HLA-A2 positivo. Los cocultivos en presencia de los linfocitos Treg intratumorales CD28+CD28- se realizaron en placas de tipo "transwell" adecuadas para separar físicamente los linfocitos Treg de las células diana de las líneas tumorales T2 y de los linfocitos CTL específicos de p540. Después, se llevaron a cabo los siguientes cocultivos:

35 a) CTL + células diana T2 no pulsadas, b) CTL+ células diana T2 pulsadas con el péptido p540 c) CTL+ células diana T2 pulsadas con el péptido p540 + Treg CD28+CD28- intratumoral, d) CTL+ células diana T2 pulsadas con el péptido p540+ Treg CD28+CD28- antitumoral + mAb anti-IL10; e) CTL+ células diana T2 pulsadas con el péptido p540 + Treg CD28+CD28+ intratumoral - mAb de control de isotipo con especificidad no significativa.

Los resultados de este experimento presentados en la Figura 3, se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad citotóxica e indican que la población de Treg CD8+CD28- también ejerce una actividad inhibidora contra la función citotóxica de las células T específicas de tumor.

EJEMPLO 1D reducción de la actividad inmunosupresora por el anticuerpo monoclonal mAb anti IL-10

50 Las actividades inmunosupresoras de la población de células Treg infiltrantes de tumor son contrarrestadas por los anticuerpos monoclonales anti-IL10, demostrando por tanto ser estrictamente dependientes de la secreción de esta citocina. La acumulación de Treg CD8+CD28- y de Treg CD4+CD25+ parece ser estrictamente dependiente del tumor ya que solo se verifica cuando la infiltración del tumor está presente tanto en el sitio del tumor primario como en los

sitios de la metástasis. De hecho, se descubrió que solo los ganglios linfáticos metastásicos, y no los que no tienen metástasis, estaban infiltrados por las poblaciones de células T reguladoras mencionadas anteriormente. (véase la figura 4)

5 EJEMPLO 1-E Verificación in vivo de la actividad inmunosupresora de la IL-10.

Los ratones negros C57 inyectados por vía subcutánea con 1×10^5 células de melanoma singénico B16 desarrollan un melanoma muy agresivo caracterizado por una invasión local devastadora y una propagación metastásica a través de la contigüidad con los órganos viscerales abdominales, si la inyección se produce en la zona abdominal. Con el fin de identificar una inmunoterapia eficaz, se realizaron diferentes estrategias que comprendían:

- 10
- a)  vacunación génica con plásmidos que codifican el antígeno gp100 humano o murino asociado a melanoma;
 - b)  vacunación subcutánea con péptidos inmunogénicos derivados de gp100 humano (hgp100₂₅₋₃₃) o murino (m_{gp100}₂₅₋₃₃) en presencia de adyuvante CpG (citosina-fosfato-guanina),
 - 15 c)  vacunación con células dendríticas (CD) precargadas con los mismos péptidos inmunogénicos (gp100).

Tanto en un contexto singénico como xenogénico, la vacunación con células dendríticas pulsadas con el péptido gp100 resultó ser el tratamiento más protector que indujo una reducción >50 % de la masa tumoral. En un experimento posterior, los ratones sometidos a "exposición" con células de melanoma B16 se inmunizaron según con el protocolo (c) en asociación con la administración de un mAb anti-IL10: dicha estrategia fue eficaz para inhibir el crecimiento tumoral completo en el 100 % de los ratones tratados, como se presenta en la Figura 5.

Dado que los estudios anteriores ya habían demostrado que la IL-10 causa la diferenciación intratumoral de las células dendríticas tolerogénicas, capaz de inducir más células T reguladoras (Guiducci et al., Cancer Res. 2005; 65; 3437-3446), en su totalidad estos datos respaldan la idea innovadora de que la IL10 tiene un papel importante en la determinación de la evasión del tumor de la vigilancia inmunitaria y que las estrategias que apuntan a bloquear los efectos de la IL-10 intratumoral a nivel funcional/molecular pueden ser enfoques eficaces para el tratamiento de tumores.

30 EJEMPLO 2 PRODUCCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN:

- ALBUMINA HUMANA - REGIÓN DE BISAGRA DE IgG1 HUMANA - DOMINIO EXTRACELULAR DE LA CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE IL 10 HUMANO.
- 35 - ALBUMINA MURINA- REGIÓN DE BISAGRA DE IgG1 MURINA - DOMINIO EXTRACELULAR DE LA CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE IL 10 MURINO

40 EJEMPLO 2.1-Preparación de la construcción del plásmido pcDNA 3.1 albúmina humana/murina - región bisagra de IgG1 humana/murina - dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL 10 humano/murino.

El plásmido de expresión pcDNA -V5-His (Life Technologies), que fue empleado para el estudio, contiene el promotor de los genes del citomegalovirus (CMV) y el fragmento de poliadenilación SV40 necesario para finalizar la transcripción y la traducción; además, también contiene el epítipo V5 y una etiqueta de His útil para la evaluación y purificación de la expresión del producto génico. La selección estable de clones en células eucariotas es posible debido a la presencia del gen de resistencia a G418. Se diseñaron dos proteínas de fusión, respectivamente una humana y una murina, uniendo el ADNc del dominio extracelular (DEC) de la cadena alfa del receptor de interleucina 10 derivado de CMSP, respectivamente humano y murino, a clones de ADNc de seroalbúmina humana y murina respectivamente adquiridos en la ATCC. Los dos ADNc se unieron solo mediante la región bisagra de la IgG1 humana y murina respectivamente derivada de CMSP. La clonación se realizó utilizando la siguiente estrategia: el ADNc del dominio extracelular (DEC) de la cadena alfa del receptor de interleucina 10 murino se clonó por PCR utilizando el siguiente par de cebadores con los sitios de restricción insertados: mL10R-KpnI directo 5'-TTAGGTACCATGTTGTGCGGTTTGCTCC-3' y mL10R NotI inverso 5'-GCGGCCGCTGTACATATGCAAGGCTTACAACC-3', el ADNc de la seroalbúmina murina se clonó por PCR utilizando el siguiente par de cebadores con los sitios de restricción insertados: SAM-NotI directo 5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAAGCACACAAGAG 3' y SAM-XbaI inverso 5' GCTCTAGAGGCTAAGGCGTCTTTG-3'. El ADNc del DEC de la cadena alfa del receptor de interleucina 10 humano se clonó por PCR utilizando el siguiente par de cebadores con los sitios de restricción insertados: hL10R-KpnI directo 5'-GGTACCATGCTGCCGTGCCTCGTAG 3' y hL10R NotI inverso 5'-GCGGCCGCTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCAACA y el ADNc de la seroalbúmina humana (SAH) se clonó por PCR utilizando el siguiente par de cebadores con los sitios de restricción insertados: SAH-NotI directo 5'-GCGGCCGCGGATGCACACAAGAGTG-3' y SAH-ApaI inverso 5' GGGCCCTTATAAGCCTAAGGCA-3'. La PCR se ejecutó en el instrumento Biorad T100.

Para confirmar la alineación exacta de los dos genes, la construcción quimérica fue secuenciada con un secuenciador automático (ABI 3100, Applied Biosystem)

65 Ejemplo 2.2 análisis y caracterización de las proteínas de fusión quiméricas murinas y humanas de la invención

Posteriormente, los productos génicos se analizaron y se evaluaron mediante análisis de transferencia Western según los siguientes modos operativos: células 293T o HEK293 se transfectaron con los dos plásmidos, pcDNA3.1 IL10R-albúmina murina y pcDNA3.1 IL10R-albúmina humana, respectivamente. Los lisados y sobrenadantes relativos de los cultivos celulares mencionados anteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) al 12,5 % en condiciones reductoras y se analizaron mediante transferencia Western, empleando anticuerpos específicos para los productos génicos (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD210 murino y anticuerpo monoclonal anti-IL10R alfa humano, anticuerpo monoclonal anti albúmina murina/humana).

Los lisados celulares y los sobrenadantes de células no transfectadas y/o transfectadas con plásmido "vacío" (es decir, que no contiene el gen quimérico) se analizaron en paralelo como controles negativos: como se esperaba, en estos, no se encontró la presencia del producto quimérico. Los resultados de este análisis se presentan en las figuras 6 y 7 respectivamente. La Figura 6 muestra la presencia de la banda del peso molecular esperado igual a 98 Kd en el carril que contiene el lisado celular de células 293T transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 que contiene el gen IL10R-albúmina murino, pero no en los carriles donde se procesaron los lisados de control. La Figura 7 muestra la presencia de la banda del peso molecular esperado igual a 98 Kd en los carriles que contienen el lisado celular o el sobrenadante de células 293T transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 que contiene el gen IL10R-albúmina humano, pero no en los carriles donde se procesó el lisado de control o el sobrenadante de control. En general, dichos datos confirman la presencia de la proteína quimérica, murina y humana, respectivamente, objeto de la invención, en el lisado y en el sobrenadante de las células transfectadas con los plásmidos que contienen los genes quiméricos (humanos y murinos, respectivamente).

EJEMPLO 3 ESTUDIOS PRELIMINARES *IN VIVO* SOBRE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN QUIMÉRICA ALBUMINA-DOMINIO EXTRACELULAR DE LA CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE IL 10.

Ejemplo 3.1 - Actividad antitumoral in vivo contra el melanoma inducido por las células tumorales de melanoma B16 por la construcción pcDNA 3.1 - albúmina murina- región bisagra de IgG1 murina - dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL 10 murino

A 3 grupos de ratones negros C57 se les inyectó respectivamente:

- 1x10⁵ células de melanoma B16 (ratones de control);
- 1x10⁵ células de melanoma B16 tratadas con un plásmido de control (pcDNA 3.1) que se inyectó por vía intradérmica (100 µg x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor);
- ▲ 1x10⁵ células de melanoma B16 tratadas con un plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 µg x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor);

Durante el experimento, las zonas de las lesiones tumorales se monitorizaron y los animales se sacrificaron, en relación con las normas éticas, cuando el mayor diámetro de la masa neoplásica alcanzó un tamaño de 2 cm. Los resultados se presentan en la figura 8. Como se deduce de esta figura, la administración del plásmido vacío no indujo ninguna diferencia significativa con respecto al grupo de control no tratado (tiempos de supervivencia <2 semanas). Por el contrario, los ratones inmunizados con la construcción del plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención, mostraron un cambio drástico y significativo de la curva de crecimiento del melanoma, de manera que tenían tiempos de supervivencia de más de 20 días en comparación con los ratones de control.

Ejemplo 3.2 Actividad antitumoral in vivo, después de la administración de células tumorales de melanoma B16, de la construcción del plásmido pcDNA 3.1- albúmina murina-región bisagra de IgG1 murina - dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL 10 murino asociado a la inmunización con células dendríticas pulsadas con péptido mgp100.

Cuatro grupos de ratones negros C57 se trataron respectivamente con:

- 1x10⁵ células de melanoma B16 (ratones de control);
- 1x10⁵ células de melanoma B16 y administración del plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 µg x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor);
- ▲ 1x10⁵ células de melanoma B16 y administración del plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 µg x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor) asociado a la inoculación intradérmica de CD (células dendríticas) pulsadas con péptido mgp100₂₅₋₃₃, que se inyectaron por vía intramuscular (2x10⁶ células/ratón x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor);
- ◆ 1x10⁵ células de melanoma B16 y administración intradérmica de CD (células dendríticas) pulsadas con péptido mgp100₂₅₋₃₃, que se inyectaron por vía intramuscular (2x10⁶ células/ratón x3 veces a intervalos de 7 días

entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor);

Durante el experimento, las zonas de las lesiones tumorales se monitorizaron y los animales se sacrificaron, en relación con las normas éticas, cuando el mayor diámetro de la masa neoplásica alcanzó un tamaño de 2 cm. Los resultados se presentan en la figura 9. A partir de estos datos, resulta que los ratones tratados con la construcción del plásmido que codifica la proteína de fusión, objeto de la invención, tienen una curva de crecimiento tumoral que es practicable superponible a la obtenida después del tratamiento con células dendríticas pulsadas con péptido mgp100₂₅₋₃₃. Esto es de gran importancia, ya que el protocolo de vacunación con células dendríticas ha demostrado ser el más eficaz entre los tratamientos inmunoterapéuticos contra el melanoma B16 (véase anteriormente, Ejemplo 1-E en la página 15): por lo tanto, el tratamiento con la construcción del plásmido que codifica la proteína de fusión, objeto de la invención, ha demostrado una eficacia igual al mejor de los tratamientos inmunoterapéuticos. Además, los ratones tratados con la construcción del plásmido que codifica la proteína de fusión, objeto de la presente invención, junto con la administración de células dendríticas pulsadas con el péptido mgp100₂₅₋₃₃, mostraron una mayor disminución significativa de la curva de crecimiento neoplásico ya que la aparición de lesiones apreciables se retrasó una semana más con respecto a los animales tratados solo con la administración de células dendríticas pulsadas con el péptido mgp100₂₅₋₃₃ o solo con el plásmido que codifica la proteína de fusión, objeto de la invención.

Ejemplo 3.3. Actividad antitumoral in vivo contra la línea celular tumoral vesical M49 de la construcción del plásmido pcDNA 3.1 -albúmina murina - región bisagra de IgG1 murina - dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL 10 murino.

Tres grupos de ratones negros C57 se trataron respectivamente con:

● 1×10^5 células de líneas celulares tumorales vesicales singénicas MB49 (control),
 ■ 1×10^5 líneas celulares tumorales vesicales singénicas MB49 y administración del plásmido de control "vacío" (pcDNA 3.1) que se inyectó por vía intradérmica (100 μ g x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor)

▲ 1×10^5 líneas celulares tumorales vesicales singénicas MB49 y administración del plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención (pcDNA3.1IL10R-SAM) que se inyectó por vía intradérmica (100 μ g x3 veces a intervalos de 7 días entre una administración y la siguiente, a partir del día de la administración del tumor)

Durante el experimento, las zonas de las lesiones tumorales se monitorizaron y los animales se sacrificaron, en relación con las normas éticas, cuando el mayor diámetro de la masa neoplásica alcanzó un tamaño de 2 cm. Los resultados se presentan en la figura 10.

Como se deduce de esta figura, los datos obtenidos con las líneas celulares tumorales M49 reproducen los datos obtenidos utilizando las células de melanoma. De hecho, la administración del plásmido vacío no indujo ninguna diferencia significativa con respecto al grupo de control no tratado (tiempos de supervivencia <2 semanas). Por el contrario, los ratones inmunizados con la construcción del plásmido que codifica la proteína de fusión quimérica según la presente invención, mostraron un cambio drástico y significativo de la curva de crecimiento del melanoma de manera que tenían tiempos de supervivencia de más de 20 días en comparación con los ratones de control.

EJEMPLO 4-Detección de los linfocitos B transgénicos

Con el fin de evaluar la persistencia y la distribución tisular del transgén, el ADN celular se extrajo de las CMSP y de los órganos (bazo, riñón, hígado, pulmón) de 4 ratones vacunados con alta velocidad de reperfusión, por vía intravenosa con una construcción polinucleotídica que codifica la albúmina murina-región bisagra murina de IgG1 murina- dominio extracelular de la cadena alfa del receptor de IL 10 murino y de 1 ratón no vacunado (control), 24 horas, 14 días y 20 días después de la vacunación. Los resultados se presentan en la figura 11. Como se deduce de dicha figura, el día 20 después de su inoculación, el transgén ya no era detectable, lo que demuestra que su semivida dentro del organismo es de aproximadamente 2 semanas.

Ejemplo 5 - Purificación de la proteína quimérica humana según la presente invención.

Las dos proteínas quiméricas humana y murina, objeto de la presente invención, se purificaron del sobrenadante de células HEK293 y EXPI-293, transfectadas con el plásmido que codifica la proteína de fusión humana y murina.

Las dos proteínas humana y murina se validaron realizando el ensayo ELISA respectivamente en dos lotes distintos, para las proteínas humanas, y en tres lotes distintos para las proteínas murinas. El ensayo ELISA realizado en la proteína quimérica humana demostró que la proteína quimérica humana reconoce específicamente la IL-10 humana y, a su vez, es reconocida por un anticuerpo humano anti albúmina marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante).

Los resultados de dicho ensayo se presentan en las figuras 12A y 12B, respectivamente.

Este experimento demuestra que la proteína producida por las células transfectadas es una proteína quimérica que tiene capacidad de receptor específica para IL-10 asociada a una estructura de albúmina.

5 De manera análoga, los resultados obtenidos con el ensayo ELISA en la proteína de fusión murina presentada en las figuras 13A y 13B, demostraron que la proteína murina se unía específicamente a la interleucina murina, lo que confirmaba la eficacia del receptor. En este caso, la detección se realizó a través de un anticuerpo anti-histidina marcado con HRP, ya que la proteína murina tiene un código de histidina.

10 A continuación se presentan las secuencias de la proteína de fusión humana y murina según la presente invención en relación a los fragmentos del dominio DEC de la unidad alfa del receptor de IL10, de la región bisagra de la inmunoglobulina gamma, de la albúmina y de los fragmentos de las construcciones polinucleotídicas correspondientes.

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Ser humano
 <400> Cadena de la secuencia previa:

MLPCLVLLA ALLSLRLGSD AHGTELPSPV SVWFEEFFH HILHWTPIPQ QSESTCYEVA	60
LLRYGIESWN SISNCSQTLS YDLTAVTLDL YHSNGYRARV RAVDGSRHSN WTVTNTFRFSV	120
DEVTLTVGSV NLEIHNGFIL GKIQLPRPKM APANDTYESI FSHFREYEIA IRKVPGNFTF	180
THKKVKHENF SLLTSGEVGE FCVQVKPSVA SRSNKGMSK EECISLTRQY FTVTNSRV	238

20 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 238
 Nombre de la secuencia: dominio extracelular de IL10 R alfa humano

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Ser humano
 <400> Cadena de la secuencia previa:
 EPKSCDKTHT CPAAA 15
 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 12
 Nombre de la secuencia: BISAGRA humana

Secuencia

35 <213> Nombre del organismo: Ser humano
 <400> Cadena de la secuencia previa:

ES 2 744 342 T3

DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA KTCVADESAE	60
NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV	120
DVMCTAFHDN EETFLKKYLY EIARRHPYFY APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP	180
KLDELREDEGK ASSAKQRLKC ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPKAEFAE VSKLVTDLTK	240
VHTECCHGDL LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLEKCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA	300
DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLRLA KTYETTLEKC	360
CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE YKFQNALLVR YTKKVPQVST	420
PTLVEVSRNL GKVGSKCKH PEAKRMPCAE DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCTES	480
LVNRRPCFSA LEVDETYVPK EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT	540
KEQLKAVMDD FAAFVEKCKK ADDKETCFAE EGKKLVAASQ AALGL	585

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 585

5 Nombre de la secuencia: Dominio de albúmina humana

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano

10 <400> Cadena de la secuencia previa:

atgctgccgt gcctcgtagt gctgctggcg ggcctcctca gcctccgtct tggctcagac	60
gctcatggga cagagctgcc cagccctcog tctgtgtggt ttgaagcaga atttttccac	120
cacatcctcc actggacacc catcccaaat cagtctgaaa gtacctgcta tgaagtggcg	180

ES 2 744 342 T3

```

ctcctgaggt atggaataga gtccctggaac tccatctcca actgtagcca gaccctgtcc      240
tatgacctta ccgcagtgac cttggacctg taccacagca atggctaccg ggccagagtg      300
cgggctgtgg acggcagccg gcaactccaac tggaccgtca ccaacacccg cttctctgtg      360
gatgaagtga ctctgacagt tggcagtgtg aacctagaga tccacaatgg cttcatcctc      420
gggaagattc agctaccag gcccaagatg gccccgcga atgacacata tgaaagcadc      480
ttcagtcact tccgagagta tgagattgcc attcgcaagg tgccgggaaa cttcacgttc      540
acacacaaga aagtaaaaca tgaaaacttc agcctcctaa cctctggaga agtgggagag      600
ttctgtgtcc aggtgaaacc atctgtcgtt tcccgaagta acaaggggat gtggtctaaa      660
gaggagtgca tctccctcac caggcagtat ttcaccgtga ccaactctag agtt          714

```

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 714

5 Nombre de la secuencia: Nucleótido de dominio extracelular de IL10 R alfa humano

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano

<400> Cadena de la secuencia previa:

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccagcgg ccgcg 45

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 45

Nombre de la secuencia: Nucleótido de BISAGRA humana

15

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón

<400> Cadena de la secuencia previa:

20

```

MLSRLLPFLV TISSLSLEFTI AYGTELPSPS YVWFEARFFQ HILHWKPIPN QSESTYYEVA      60

```

```

LKQYGNSTWN DIHICRKAQA LSCDLTFTFL DLYHRSYGYR ARVRAVDNSQ YSNWTTTETR      120

```

```

FTVDEVILTV DSVTLKAMDG IIYGTIHPPR PTITPAGDEY EQVFKDLRVY KISIRKFSEL      180

```

```

KNATKRVKQE TFTLTVPIGV RKFCVKVLPV LESRINKAEW SEEQCLLITT EQYFTVTNLS      240

```

```

IKLI          244

```

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 244

25 Nombre de la secuencia: Dominio extracelular de IL10 R alfa de ratón

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón

<400> Cadena de la secuencia previa:

VPRDCGCKPC ICTGGR 16

<212> Tipo: PRT

30

ES 2 744 342 T3

<211> Longitud: 16

Nombre de la secuencia: bisagra de ratón

Secuencia

5

<213> Nombre del organismo: ratón

<400> Cadena de la secuencia previa:

EAHKSEIAHR YNDLGEQHFK GLVLIAFSQY LQKCSYDEHA KLVQEVTDFA KTCVADESAA	60
NCDKSLHTLF GDKLCAIPNL RENYGELADC CTKQEPERNE CFLQHKDDNP SLPPFERPEA	120
EAMCTSFKEN PTTFMGHYLH EVARRHPYFY APELLLYAEQ YNEILTQCCA EADKESCLTP	180
KLDGVKEKAL VSSVRQRMKC SSMQKFGERA FKAWAVARLS QTFPNADFAE ITKLATDLTK	240
VNKECCHGDL LECADDRAEL AKYMCENQAT ISSKLQTCDD KPLLKKAHCL SEVEHDTMPA	300
DLPAIAADFV EDQEVCKNYA EAKDVFLGTF LYEYSRRHPD YSVSLLLRLA KKYEATLEKC	360
CAEANPPACY GTVLAEFQPL VEEPKNLVKT NCDLYEKLGE YGFQNAILVR YTQKAPQVST	420
PTLVEAARNL GRVGTKCCTL PEDQRLPCVE DYLSAILNRV CLLHEKTPVS EHVTKCCSGS	480
LVERRPCFSA LTVDETYVPK EFKAETFTFH SDICTLPEKE KQIKKQTALA ELVKHKPKAT	540
AEQLKTMDD FAQFLDTCK AADKDTCFST EGPNLVTRCK DALA	584

10

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 584

Nombre de la secuencia: Dominio de albúmina murina

Descripción de la secuencia:

15

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón

<400> Cadena de la secuencia previa:

20

ES 2 744 342 T3

atgttgctgc gtttgctccc attcctcgtc acgatctcca gcctgagcct agaattcatt 60
gcatacggga cagaactgcc aagcccttcc tatgtgtggt ttgaagccag atttttccag 120
cacatcctcc actggaaacc tatcccaaac cagtctgaga gcacctaata tgaagtggcc 180
ctcaaacagt acggaaactc aacctggaat gacatccata tctgtagaaa ggctcaggca 240
ttgtcctgtg atctcacaac gttcaccttg gatctgtatc accgaagcta tggctaccgg 300
gccagagtcc gggcagtgga caacagtcag tactccaact ggaccaccac tgagactcgc 360
ttcacagtgg atgaagtgat tctgacagtg gatagcgtga ctctgaaagc aatggaocggc 420
atcatctatg ggacaatcca tccccccagg cccacgataa ccctgcagg ggatgagtac 480
gaacaagtct tcaaggatct ccgagtttac aagatttcca tccggaagtt ctcagaacta 540
aagaatgcaa ccaagagagt gaaacaggaa accttcaccc tcacggctcc cataggggtg 600
agaaagtttt gtgtcaaggt gctgccccgc ttggaatccc gaattaacaa gccagagtgg 660
tcggaggagc agtgtttact taccacgacg gagcagtatt tcaactgtgac caacctgagc 720
atcaagctta tt 732

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 732

5 Nombre de la secuencia: Nucleótido de dominio extracelular de IL10 R alfa de ratón

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón

10 <400> Cadena de la secuencia previa:

gtgccagggt atgtggtg taagcctg atatgtacag gcggccgc 48

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 48

15 Nombre de la secuencia: Nucleótido de bisagra de ratón

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón

20 <400> Cadena de la secuencia previa:

ES 2 744 342 T3

gaagcacaca agagtgagat cgcccatcgg tataatgatt tgggagaaca acatttcaaa	60
ggcctagtcc tgattgcctt ttcccagtat ctccagaaat gctcatacga tgagcatgcc	120
aaattagtgc aggaagtaac agactttgca aagacgtgtg ttgccgatga gtctgccgcc	180
aactgtgaca aatcccttca cactcttttt ggagataagt tgtgtgccat tccaaacctc	240
cgtgaaaact atgggtgaact ggctgactgc tgtacaaaac aagagcccga aagaaacgaa	300
tgtttcctgc aacacaaaga tgacaacccc agcctgccac catttgaaag gccagaggct	360
gaggccatgt gcacctcctt taaggaaaac ccaaccacct ttatgggaca ctatttgcac	420
gaagttgcca gaagacatcc ttattttctat gccccagaac ttctttacta tgctgagcag	480
tacaatgaga ttctgaccga gtgttgatga gaggctgaca aggaaagctg cctgacccccg	540
aagcttgatg gtgtgaagga gaaagcattg gtctcatctg tccgtcagag aatgaagtgc	600
tccagtatgc agaagtttgg agagagagct tttaaagcat gggcagtagc tcgtctgagc	660
cagacattcc ccaatgctga ctttgcagaa atcaccaaat tggcaacaga cctgacccaaa	720
gtcaacaagg agtgctgcca tggtgacctg ctggaatgcg cagatgacag ggcggaactt	780
gccaaagtaca tgtgtgaaaa ccaggcgact atctccagca aactgcagac ttgctgcat	840
aaaccactgt tgaagaaagc cactgtctt agtgaggtgg agcatgacac catgcctgct	900
gatctgctg ccattgctgc tgattttggt gaggaccagg aagtgtgcaa gaactatgct	960
gaggccaagg atgtcttcct gggcacgttc ttgtatgaat attcaagaag acaccctgat	1020
tactctgtat ccctgttgct gagacttgct aagaaatatg aagccactct ggaaaagtgc	1080

ES 2 744 342 T3

tcgcctgaag ccaatcctcc cgcattgctac ggcacagtgc ttgctgaatt tcagcctctt 1140
gtagaagagc ctaagaactt ggtcaaaaacc aactgtgatc tttacgagaa gcttggagaa 1200
tatggattcc aaaatgccat tctagtctgc tacacccaga aagcacctca ggtgtcaacc 1260
ccaactctcg tggaggctgc aagaaaccta ggaagagtgg gcaccaagtg ttgtactctt 1320
cctgaagatc agagactgcc ttgtgtggaa gactatctgt ctgcaatcct gaaccgtgtg 1380
tgtctgctgc atgagaagac cccagtgagt gagcatgtta ccaagtgtcg tagtggatcc 1440
ctggtggaaa ggcggccatg cttctctgct ctgacagttg atgaaacata tgtccccaaa 1500
gagtttaaag ctgagacctt caccttccac tetgatatct gcacacttcc agagaaggag 1560
aagcagatta agaaacaaac ggctcttgct gagctggtga agcacaagcc caaggctaca 1620
gctggagcaac tgaagactgt catggatgac tttgcacagt tcctggatac atgttgcaag 1680
gctgctgaca aggacacctg cttctcgact gaggggtccaa accttgtcac tagatgcaaa 1740
gacgccttag cctaa 1755

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 1755

5 Nombre de la secuencia: Nucleótido de dominio de albúmina murina

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano

10 <400> Cadena de la secuencia previa:

gatgcacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa 60
gccttgggtg tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta 120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt 240
cgtgaaacct atgggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaaac aagaacctga gagaaatgaa 300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattggtgag accagaggtt 360

ES 2 744 342 T3

gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat	420
gaaattgccca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg	480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctggttgcca	540
aagctcgatg aacttcggga tgaaggggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt	600
gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc	660
cagagatttc ccaaagctga gtttgcagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa	720
gtccacacgg aatgctgccca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt	780
gccaaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa	840
aaacctctgt tggaaaaatc ccaactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct	900
gacttgctt cattagctgc tgattttggt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct	960
gaggcaaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcacccctgat	1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc	1080
tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt	1140
gtggaagagc ctcagaattt aatcaaaaaa aattgtgagc tttttgagca gcttgagag	1200
tacaaattcc agaatgcgct attagtctgt tacaccaaga aagtacccca agtgtcaact	1260
ccaactcttg tagaggtctc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat	1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggtcct gaaccagtta	1380
tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaatgctg cacagaatcc	1440
ttggtgaaca ggcgtccatg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaaa	1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag	1560
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca	1620
aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttcgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag	1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttggtgc tgcaagtcaa	1740
gctgccttag gcttataa	1758

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1758
Nombre de la secuencia: nucleótido de dominio de albúmina humana

5 Solicitante de la Organización

Calle: Vía S.G. Cottolengo 15
Ciudad: MILÁN
Estado: MI
10 País: ITALIA
Código postal: 20143
Número de teléfono:
Número de fax:
Dirección de correo electrónico:
15 <110> Nombre de la Organización: MEDIOLANUM FARMACEUTICI S.p.A.

Proyecto de la Solicitud

<120> Título: UN RECEPTOR QUÍMICO SOLUBLE DE INTERLEUCINA 10 Y SU USO TERAPÉUTICO.
20 <130> Referencia de archivo de la solicitud: P05076PCT
<140> Número actual de la solicitud:
<141> Fecha actual del archivo:

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Ser humano
<400> Cadena de la secuencia previa:

MLPCLVLLLA ALLSLRLGSD AHGTELPSP SVWFEEAEFFH HILHWTPIPN QSESTCYEVA
60
LLRYGIESWN SISNCSQTLS YDLTAVTLDL YHSNGYRARV RAVDGSRHSN WTVTNTRFVS
120
DEVTLTVGVS NLEIHNGFIL GKIQLPRPKM APANDTYESI FSHFREYEIA IRKVPGNFTF
180
THKKVKHENF SLLTSGEVGE FCVQVKPSVA SRSNKG MWSK EECISLTRQY FTVTNSRV
238

30 <212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 238

Nombre de la secuencia: dominio extracelular de IL10 R alfa humano

35 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano
<400> Cadena de la secuencia previa:
40 EPKSCDKTHT CPAAA 15
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 15

Nombre de la secuencia: BISAGRA humana

45 Secuencia

50 <213> Nombre del organismo: Ser humano
<400> Cadena de la secuencia previa:

DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA KTCVADES
60
NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYEMADC CAKQEPERNE CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV
120
DVMCTAFHDN EETFLKKYLY EIARRHPYFY APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAA
180

ES 2 744 342 T3

KLDELRLDEGK ASSAKQRLKC ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPKAEFAE VSKLVTDLTK
240
VHTECCHGDL LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA
300
DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLRLA KTYETTLEKC
360
CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE YKFQNALLVR YTKKVPQVST
420
PTLVEVSRNL GKVGSKCCKH PEAKRMPCAE DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCTES
480
LVNRRPCFSA LEVDETYVPK EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT
540
KEQLKAVMDD FAAFVEKCK ADDKETCFAE EGKKLVAASQ AALGL
585

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 585

5 Nombre de la secuencia: Dominio de albúmina humana

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano

10 <400> Cadena de la secuencia previa:

atgctgccgt gcctcgtagt gctgctggcg gcgctcctca gcctccgtct tggctcagac
60
gctcatggga cagagctgcc cagccctccg tctgtgtggt ttgaagcaga atttttccac
120
cacatcctcc actggacacc catcccaaat cagtctgaaa gtacctgcta tgaagtggcg
180
ctcctgaggt atggaataga gtccctggaac tccatctcca actgtagcca gaccctgtcc
240
tatgacctta ccgcagtgac cttggacctg taccacagca atggctaccg ggccagagtg
300
cgggctgtgg acggcagccg gcaactccaac tggaccgtca ccaacaccog cttctctgtg
360
gatgaagtga ctctgacagt tggcagtggt aacctagaga tccacaatgg cttcatcctc
420
gggaagattc agctaccag gcccaagatg gccccgcga atgacacata tgaagcatc
480
ttcagtcact tccgagagta tgagattgcc attcgcaagg tgccgggaaa cttcacgttc
540
acacacaaga aagtaaaaca tgaaaacttc agcctcctaa cctctggaga agtgggagag
600
ttctgtgtcc aggtgaaacc atctgtcgct tcccgaagta acaaggggat gtggtctaaa
660
gaggagtgca tctccctcac caggcagtat ttcaccgtga ccaactctag agtt
714

<212> Tipo: ADN

15 <211> Longitud: 714

Nombre de la secuencia: Nucleótido de dominio extracelular de IL10 R alfa humano

Secuencia

20 <213> Nombre del organismo: Ser humano

<400> Cadena de la secuencia previa:

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccagcgg ccgcg
45

<212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 45
 Nombre de la secuencia: Nucleótido de BISAGRA humana

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón
 <400> Cadena de la secuencia previa:

10

MLSRLLPFLV TISSLSLEFI AYGTELPSPS YVWFEARFFQ HILHWKPIP N QSESTYYEVA
 60
 LKQYGNSTWN DIHICRKAQA LSCDLTFFTL DLYHRSYGYR ARVRAVDNSQ YSNWTTTETR
 120
 FTVDEVILTV DSVTLKAMDG IIYGTIHPPR PTITPAGDEY EQVFKDLRVY KISIRKFSEL
 180
 KNATKRVKQE TFLLTVPIGV RKFCVKVLPR LESRINKAEW SEEQCLLITT EQYFTVTNLS
 240
 IKLI

244
 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 244
 Nombre de la secuencia: Dominio extracelular de IL10 R alfa de ratón

15

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón
 <400> Cadena de la secuencia previa:

20

VPRDCGCKPC ICTGGR
 16

<212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 16
 Nombre de la secuencia: bisagra de ratón

25

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón
 <400> Cadena de la secuencia previa:

30

EAHKSEIAHR YNDLGEQHF K GLVLIAFSQY LQKCSYDEHA KLVQEVTDFA KTCVADESAA
 60
 NCDKSLHTLF GDKLCAIPNL RENYGELADC CTKQEPERNE CFLQHKDDNP SLPPFERPEA
 120
 EAMCTSFKEN PTTFMGHYLH EVARRHPYFY APELLLYAEQ YNEILTQCCA EADKESCLTP
 180
 KLDGVKEKAL VSSVRQRMKC SSMQKFGERA FKAWAVARLS QTFPNADFAE ITKLATDLTK
 240
 VNKECCHGDL LECADDRAEL AKYMCENQAT ISSKLQTCDD KPLLKKAHCL SEVEHDTMPA
 300
 DLPAIAADFV EDQEVCKNYA EAKDVFLGTF LYEYSRRHPD YSVSLLLRLA KKYEATLEKC
 360
 CAEANPPACY GTVLAEFQPL VEEPKNLVKT NCDLYEKLGE YGFQNAILVR YTQKAPQVST
 420
 PTLVEAARNL GRVGTKCCTL PEDQRLPCVE DYLSAILNRV CLLHEKTPVS EHVTKCCSGS
 480
 LVERRPCFSA LTVDETYVPK EFKAETFFH SDICTLPEKE KQIKKQTALA ELVKHKPKAT
 540
 AEQLKTMDD FAQFLDTCK AADKDTCFST EGPNLVTRCK DALA
 584

35

ES 2 744 342 T3

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 584
Nombre de la secuencia: Dominio de albúmina murina

5

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón
<400> Cadena de la secuencia previa:

10

```
atgttgtcgc gtttgctccc attcctcgtc acgatctcca gcctgagcct agaattcatt
60
gcatacggga cagaactgcc aagcccttcc tatgtgtggt ttgaagccag atttttccag
120
cacatcctcc actggaaacc tatcccaaac cagtctgaga gcacctacta tgaagtggcc
180
ctcaaacagt acggaaactc aacctggaat gacatccata tctgtagaaa ggctcaggca
240
ttgtcctgtg atctcacaac gttcacctcg gatctgtatc accgaageta tggctaccgg
300
gccagagtcc gggcagtgga caacagtcag tactccaact ggaccaccac tgagactcgc
360
ttcacagtgg atgaagtgat tctgacagtg gatagcgtga ctctgaaagc aatggacggc
420
atcatctatg ggacaatcca tccccccagg cccacgataa ccctgcagg ggatgagtac
480
gaacaagtct tcaaggatct ccgagtttac aagatttcca tccggaagtt ctcagaacta
540
aagaatgcaa ccaagagagt gaaacaggaa accttcaccc tcacgggtccc cataggggtg
600
agaaagtttt gtgtcaaggt gctgccccgc ttggaatccc gaattaacaa ggcagagtgg
660
tcggaggagc agtgtttact tatcacgacg gagcagtatt tcaactgtgac caacctgagc
720
atcaagctta tt
732
```

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 732
Nombre de la secuencia: Nucleótido de dominio extracelular de IL10 R alfa de ratón

15

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón
<400> Cadena de la secuencia previa:

20

```
gtgcccaggg attgtggttg taagccttgc atatgtacag gcggccgc
48
```

<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 48
Nombre de la secuencia: Nucleótido de bisagra de ratón

25

Secuencia

<213> Nombre del organismo: ratón
<400> Cadena de la secuencia previa:

30

ES 2 744 342 T3

gaagcacaca agagtgagat cgcccatcgg tataatgatt tgggagaaca acatttcaaa
 60
 ggcctagtcc tgattgcctt ttcccagtat ctccagaaat gctcatacga tgagcatgcc
 120
 aaattagtgc aggaagtaac agactttgca aagacgtgtg ttgccgatga gtctgccgcc
 180
 aactgtgaca aatcccttca cactcttttt ggagataagt tgtgtgccat tccaaacctc
 240
 cgtgaaaact atggtgaact ggctgactgc tgtacaaaac aagagcccga aagaaacgaa
 300
 tgtttctgc aacacaaaga tgacaacccc agcctgccac catttgaaag gccagaggct
 360
 gaggccatgt gcacctcctt taaggaaaac ccaaccacct ttatgggaca ctatttgcac
 420
 gaagttgcca gaagacatcc ttatttctat goccagaaac ttctttacta tgctgagcag
 480
 tacaatgaga ttctgacca gtgttgca gaggtgaca aggaaagctg cctgaccccc
 540
 aagcttgatg gtgtgaagga gaaagcattg gtctcatctg tccgtcagag aatgaagtgc
 600
 tccagtatgc agaagtttgg agagagagct tttaaagcat gggcagtagc tcgtctgagc
 660
 cagacattcc ccaatgctga ctttgacaga atcaccaaat tggcaacaga cctgacccaa
 720
 gtcaacaagg agtgctgcca tggtgacctg ctggaatgcg cagatgacag ggcggaactt
 780
 gccaagtaca tgtgtgaaaa ccaggcgact atctccagca aactgcagac ttgctgcgat
 840
 aaaccactgt tgaagaaagc ccactgtctt agtgagggtg agcatgacac catgctgct
 900
 gatctgcctg ccattgctgc tgattttgtt gaggaccagg aagtgtgcaa gaactatgct
 960
 gaggccaagg atgtcttctt gggcacgttc ttgtatgaat attcaagaag acacctgat
 1020
 tactctgtat ccctgttgct gagacttgct aagaaatatg aagccactct ggaaaagtgc
 1080
 tgcgctgaag ccaatcctcc cgcattgctac ggcacagtgc ttgctgaatt tcagcctctt
 1140
 gtagaagagc ctaagaactt ggtcaaaacc aactgtgatc tttacgagaa gcttgagaa
 1200
 tatggattcc aaaatgccat tctagttcgc tacaccaga aagcacctca ggtgtcaacc
 1260
 ccaactctcg tggaggctgc aagaaaccta ggaagagtgg gcaccaagtg ttgtacactt
 1320
 cctgaagatc agagactgcc ttgtgtggaa gactatctgt ctgcaatcct gaaccgtgtg
 1380
 tgtctgctgc atgagaagac cccagtgagt gagcatgta ccaagtgtg tagtggatcc
 1440
 ctggtggaaa ggcggccatg cttctctgct ctgacagttg atgaaacata tgtcccaaa
 1500
 gagtttaaag ctgagacctt caccttccac tctgatatct gcacacttcc agagaaggag
 1560
 aagcagatta agaaacaaac ggctcttgct gagctgggtga agcacaagcc caaggctaca
 1620
 gcggagcaac tgaagactgt catggatgac tttgcacagt tcctggatac atgttgcaag
 1680

ES 2 744 342 T3

gctgctgaca aggacacctg cttctcgact gaggggtccaa accttgtcac tagatgcaaa
1740
gacgccttag cctaa
1755

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 1755

5 Nombre de la secuencia: Nucleótido de dominio de albúmina murina

Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano

10 <400> Cadena de la secuencia previa:

gatgcacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa
60
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta
120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa
180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt
240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa
300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattggtgag accagaggtt
360
gatgtgatgt gcaactgctt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat
420
gaaattgcca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg
480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgctg cctgttgcca
540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt
600
gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc
660
cagagatttc ccaaagctga gtttgacaga gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaa
720
gtccacacgg aatgctgcca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt
780
gccaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa
840
aaacctctgt tggaaaaatc ccaactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct
900
gacttgctt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct
960
gaggcaaagg atgtcttcct gggcatgtt ttgtatgaat atgcaagaag gcatcctgat
1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc
1080
tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt
1140
gtggaagagc ctcagaattt aatcaacaa aattgtgagc tttttgagca gcttgagag
1200
tacaaattcc agaatgcgct attagttcgt tacaccaaga aagtacocca agtgtcaact
1260
ccaactcttg tagaggctc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat
1320

ES 2 744 342 T3

```
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta
1380
tgtgtggttc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaatgctg cacagaatcc
1440
ttggtgaaca ggcgtccatg cttttcagct ctggaagtcg atgaaacata cgttcccaaa
1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag
1560
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca
1620
aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag
1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttgttgc tgcaagtcaa
1740
gctgccttag gcttataa
1758
```

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 1758

5

Nombre de la secuencia: nucleótido de dominio de albúmina humana

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión quimérica que comprende albúmina y el dominio extracelular de la unidad alfa del receptor de interleucina 10 (IL10).
2. La proteína de fusión quimérica según la reivindicación 1, en donde dicha albúmina es una seroalbúmina de mamífero.
- 10 3. La proteína de fusión quimérica según la reivindicación 2, en donde dicho suero de mamífero es humano o murino.
4. La proteína de fusión quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho dominio extracelular de la unidad alfa del receptor de IL10 proviene de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de mamífero.
- 15 5. La proteína de fusión quimérica según la reivindicación 4, en donde dichas CMSP son humanas o murinas.
6. La proteína de fusión quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la albúmina se une a dicho dominio extracelular de la unidad alfa del receptor de IL10 mediante un espaciador.
- 20 7. La proteína quimérica según la reivindicación 6, en donde dicho espaciador es la región bisagra de una inmunoglobulina gamma G (IgG).
8. La proteína de fusión quimérica según la reivindicación 7, en donde dicha IgG es IgG1.
- 25 9. La proteína de fusión quimérica según la reivindicación 7 u 8, en donde dicha IgG proviene de CMSP de mamífero.
10. La proteína de fusión quimérica según la reivindicación 9, en donde dichas CMSP son humanas o murinas.
- 30 11. Una construcción polinucleotídica que codifica la proteína de fusión quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. La construcción polinucleotídica según la reivindicación 11, que es un gen.
- 35 13. La construcción polinucleotídica según la reivindicación 12, en donde dicho gen está comprendido en un vector.
14. La construcción polinucleotídica según la reivindicación 13, en donde dicho vector es un plásmido.
- 40 15. La proteína de fusión quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en el tratamiento de patologías correlacionadas con IL10.
- 45 16. La proteína quimérica para su uso según la reivindicación 15, en donde dichas patologías son cáncer y lupus eritematoso sistémico (LES).
17. La construcción polinucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, para su uso en el tratamiento de patologías correlacionadas con IL10.
18. La construcción polinucleotídica para su uso según la reivindicación 17, en donde dichas patologías son cáncer y LES.

Fig 1

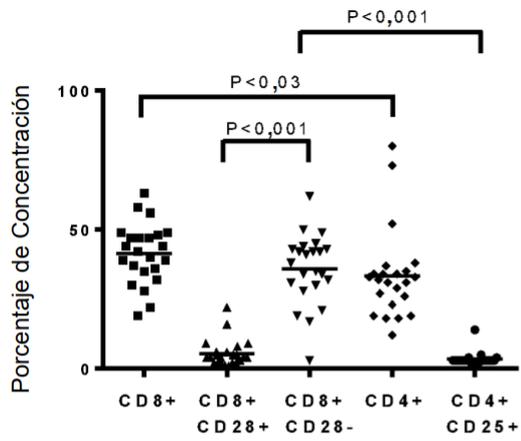


Fig2

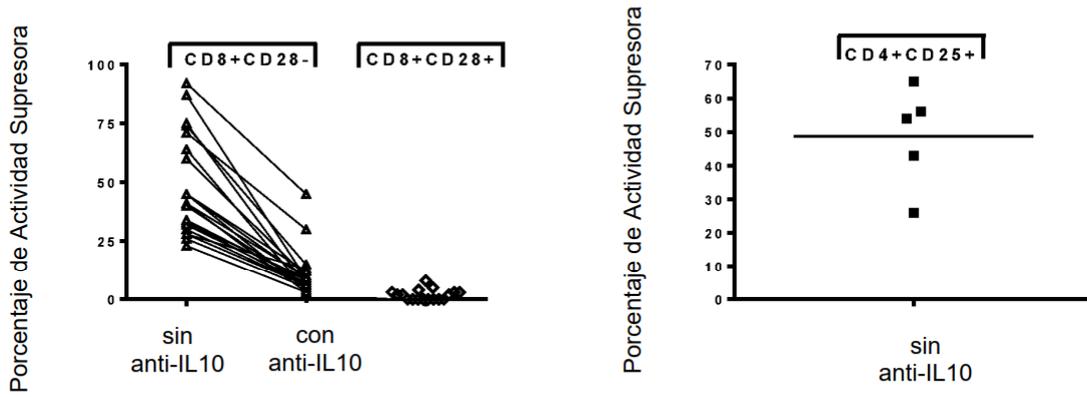


Fig3

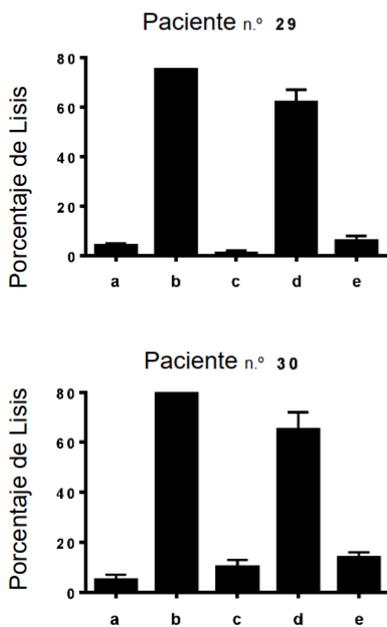


Fig 4

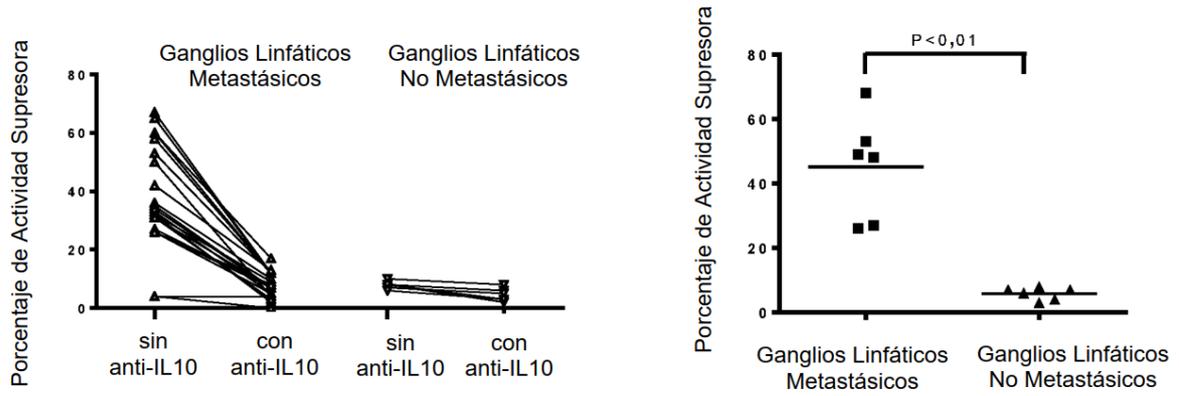


Fig 5

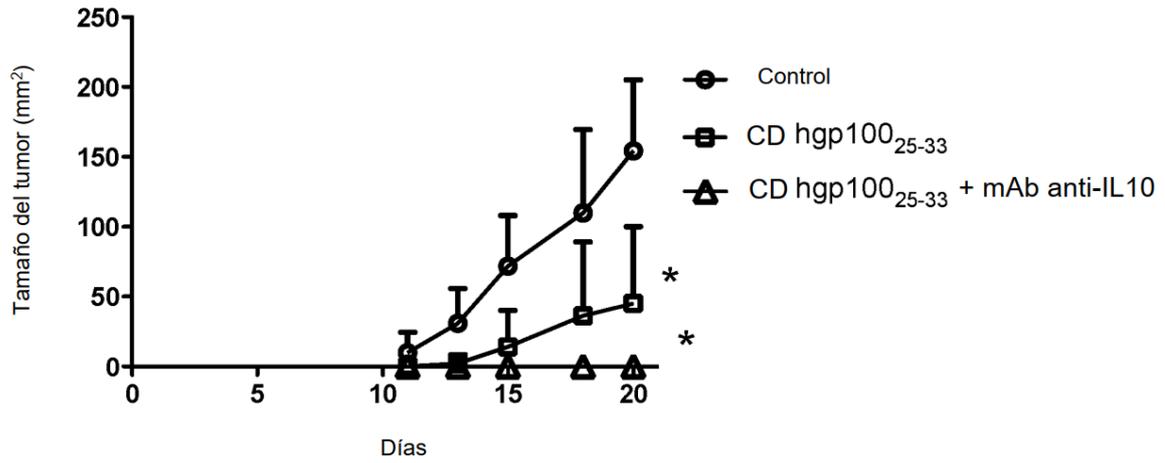


Fig 6

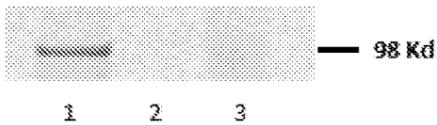


Fig 7

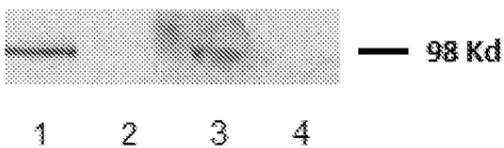


Fig 8

* $p < 0,007$

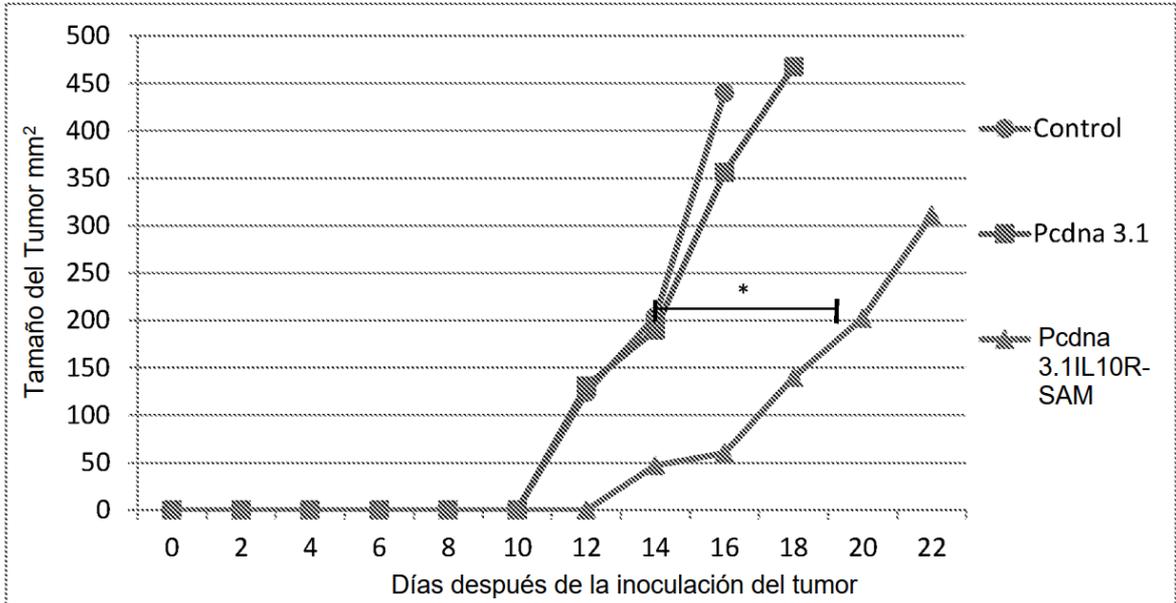


Fig 9

* $p < 0,0002$

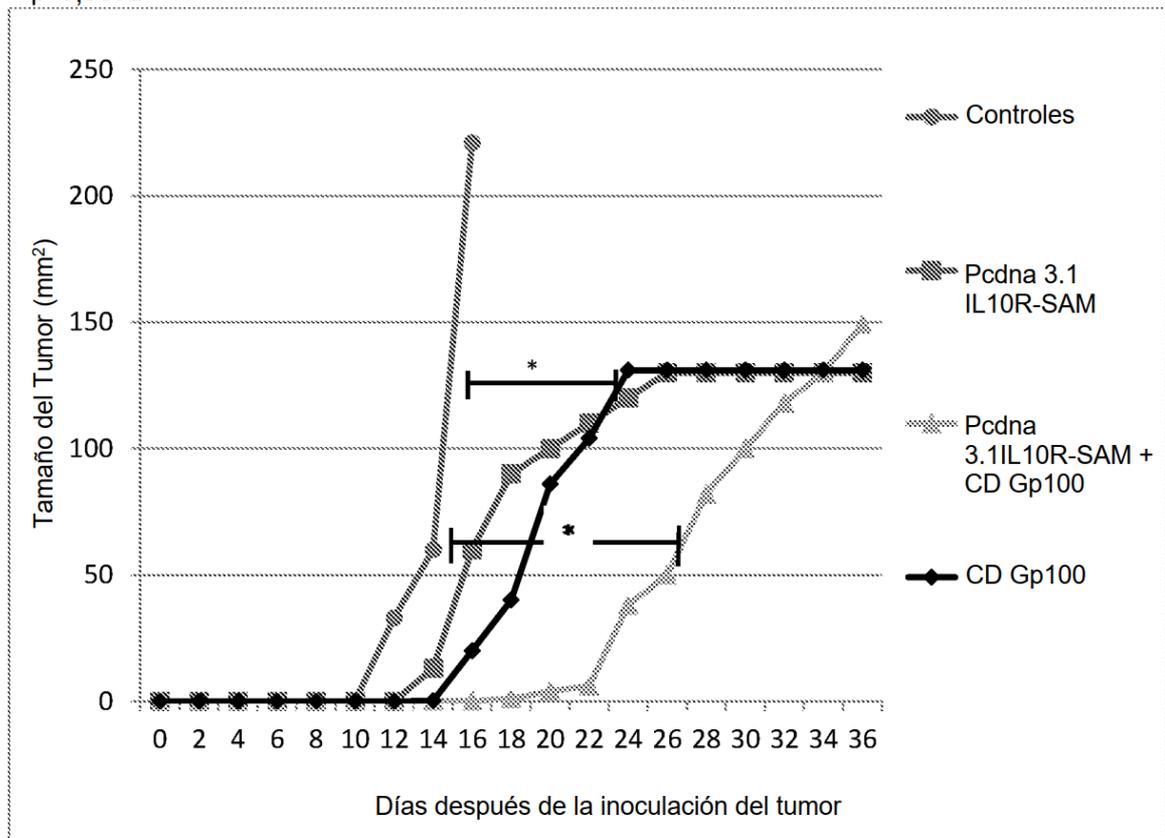


Fig 10

*p=0,03

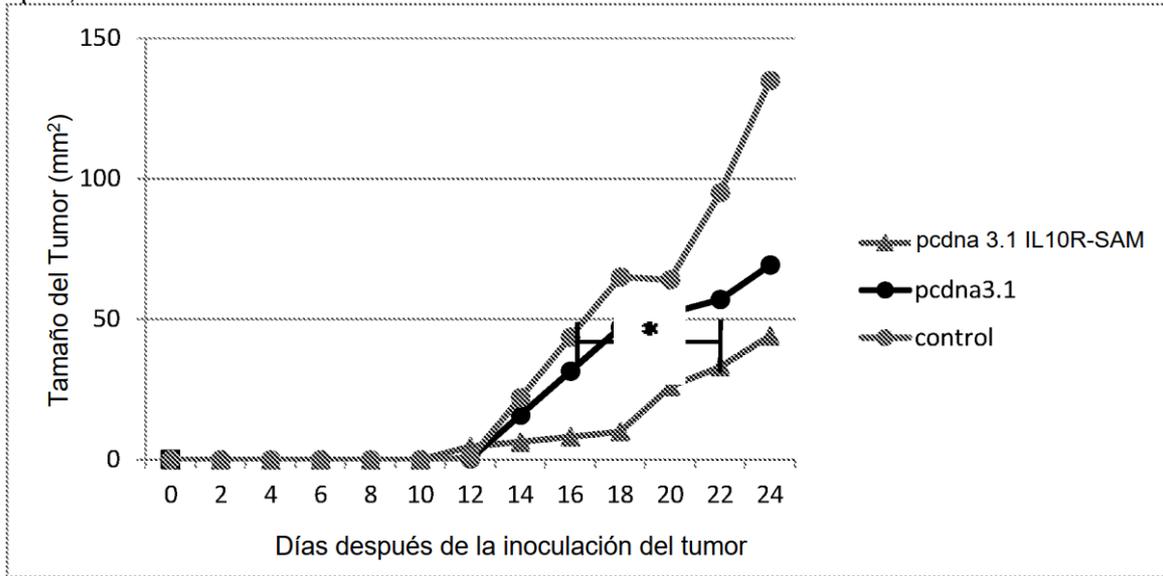


Fig 11

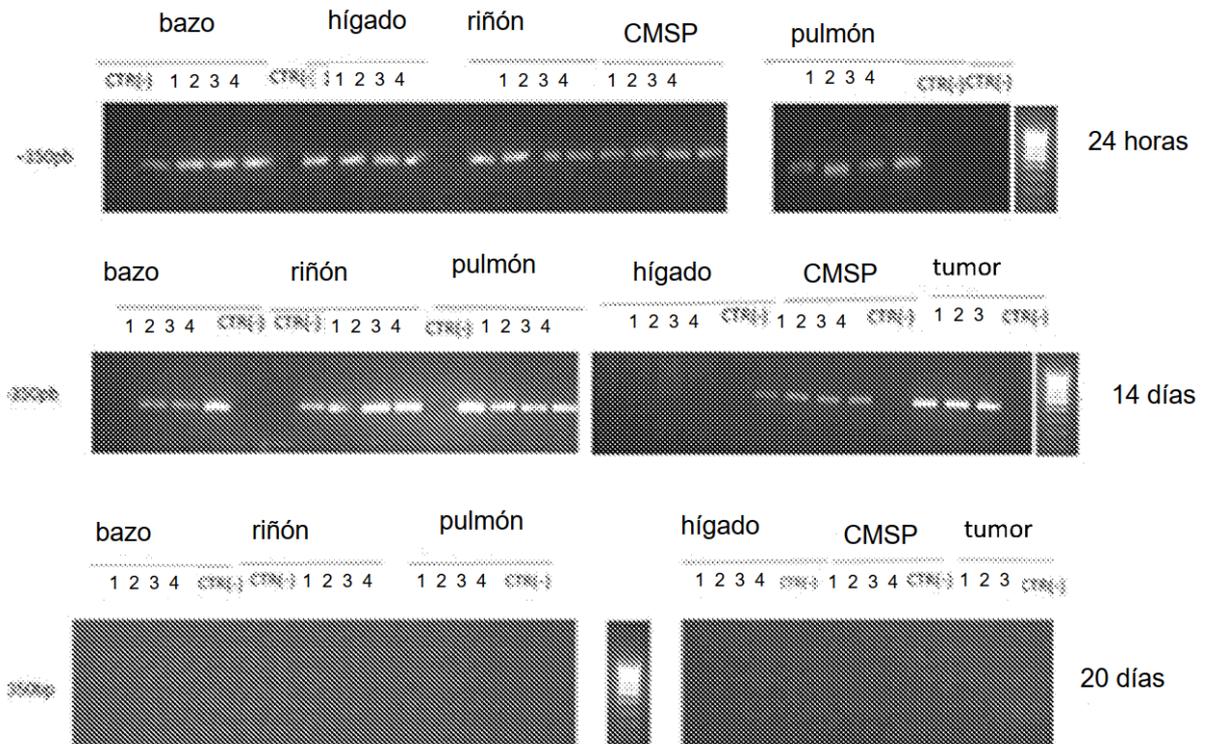


Fig.12 A

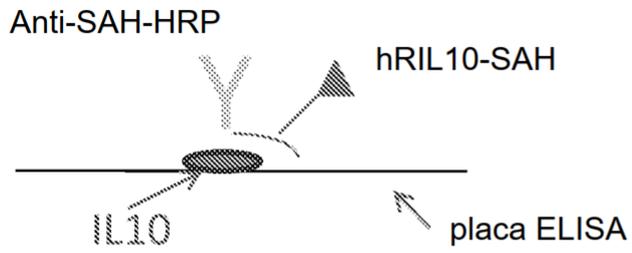


Fig.12B

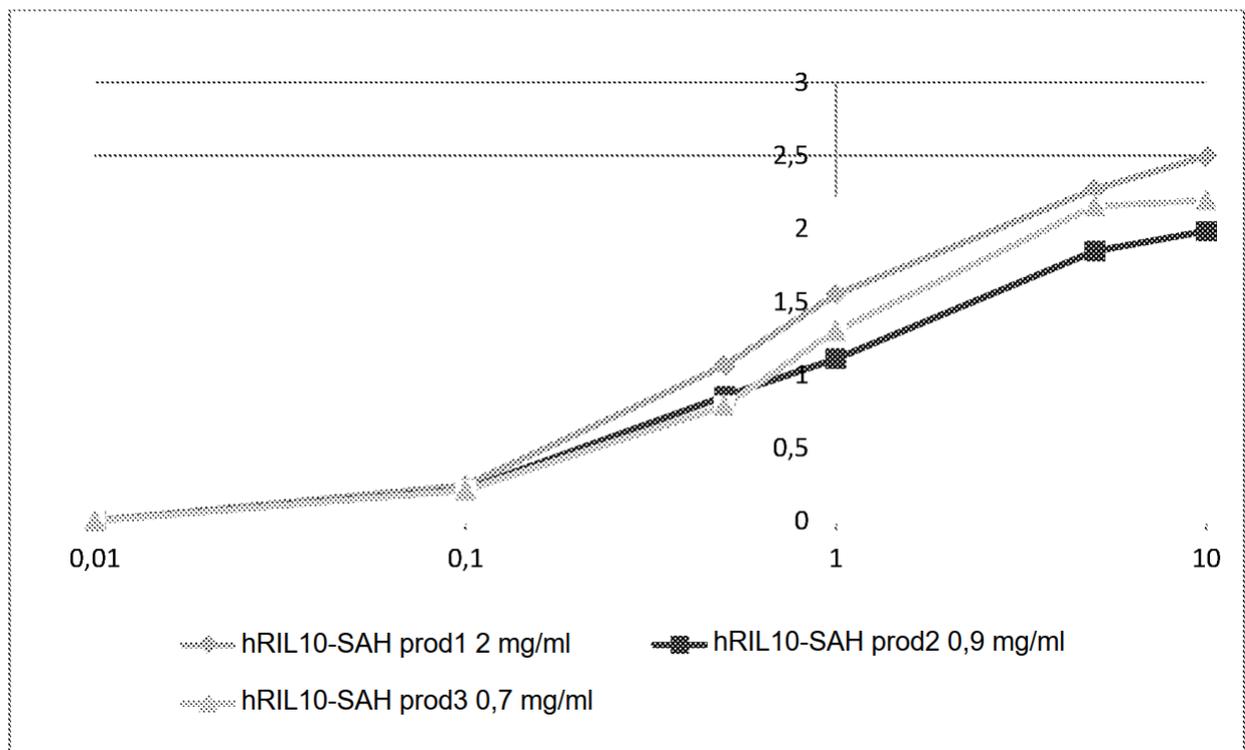


FIG.13A

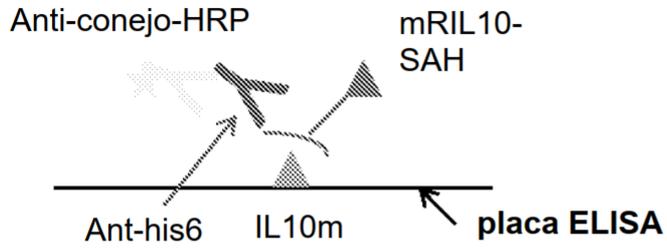


FIG.13B

