

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 501**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014** **E 17195867 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 3299466**

54 Título: **Fusocinas que implican citocinas con afinidades de unión al receptor fuertemente reducidas**

30 Prioridad:

18.07.2013 EP 13306034

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

29.04.2020

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;
BULTINCK, JENNYFER;
GERLO, SARAH;
UZÉ, GILLES;
PAUL, FRANCIANE y
BORDAT, YANN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 757 501 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

Fusocinas que implican citocinas con afinidades de unión al receptor fuertemente reducidas

- 5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende XCL1 e IFN α 2, de los cuales IFN α 2 es una citocina modificada con una afinidad de unión fuertemente reducida a su receptor, o a uno de sus receptores. Preferentemente, ambas citocinas se conectan mediante un enlazador, preferentemente un enlazador GGS. La invención se relaciona además a dicha proteína de fusión para su uso en el tratamiento de enfermedades.
- 10 Las citocinas son pequeñas proteínas secretadas o unidas a la membrana que juegan un papel crucial en la comunicación intercelular. La unión de la citocina a su complejo de receptores cognados activa una cascada de eventos de señalización intracelular que permite que la célula detecte y responda a su entorno según las necesidades de la célula, el tejido y el órgano del cual forman parte. Son característicamente pleiotrópicas, lo que significa que provocan una amplia gama de respuestas según la naturaleza y el estado de desarrollo de la célula diana. Además,
- 15 algunas de ellas son altamente redundantes ya que muchas citocinas tienen actividades que se superponen, lo que les permiten compensar de forma funcional la pérdida mutua. Las actividades de las citocinas pueden ser autócrinas, parácrinas o endócrinas, lo que genera un límite débil entre el término designado citocina, hormona peptídica y factor de crecimiento.
- 20 Se conocen seis clases estructurales diferentes de citocinas: las citocinas del haz α -helicoidal que comprende la mayoría de las interleucinas, factores estimulantes de colonias y hormonas como la hormona de crecimiento y la leptina (Nicola y Hilton, 1998), la familia del factor de necrosis tumoral trimérica (TNF) (Idriss y Naismith, 2000), los factores de crecimiento del nudo de cisteína (Sun y Davies, 1995), el grupo de pliegues β -trébol que incluye la familia de interleucina-1 (Murzin y col., 1992), la familia de interleucina 17 (IL-17) (Gaffen, 2011) y las quimiocinas (Nomiyama
- 25 y col., 2013).]

Varias citocinas han encontrado importantes aplicaciones clínicas. Los ejemplos incluyen la eritropoyetina (Epo), el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), los interferones α 2 y β y la hormona de crecimiento. Por el contrario, frecuentemente como consecuencia de su naturaleza proinflamatoria, antagonizar las citocinas

30 seleccionadas también tiene aplicaciones médicas específicas. Los ejemplos principales en este caso son las estrategias para bloquear la actividad TNF α para combatir las enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide. Dado el éxito de esto, se están explorando estrategias para optimizar la actividad de las citocinas en el ámbito clínico. Esto incluye una semivida optimizada, menor inmunogenicidad, administración dirigida a los tipos específicos de células y las fusiones genéticas de dos citocinas, llamadas fusocinas.

- 35 Las fusocinas son combinaciones artificiales de dos citocinas diferentes que están genéticamente unidas mediante una secuencia de enlace. El primer ejemplo de una fusocina es pXY321 o pixicina que es una proteína de fusión del factor de estimulación de colonias de macrófagos- granulocitos (GM-CSF) e IL-3 (Donahue y col., 1988) que demostró tener efectos hematopoyéticos e inmunitarios superiores a cualquier citocina por sí sola. Este efecto puede explicarse
- 40 mediante la mejora de la unión a sus respectivos complejos de receptores. Cabe destacar que ambos receptores comparten la subunidad β c de señalización, lo que descarta los efectos sinérgicos al nivel de transducción de la señal. En un ensayo clínico de fase III, pXY321 no demostró propiedades superiores al compararse con GM-CSF solo (O'Shaughnessy y col., 1996). También se exploraron las fusocinas a base de GM-CSF con citocinas de la familia IL-2. Todas estas citocinas señalan a través de complejos de receptores que comprenden la subunidad γ c. Los ejemplos
- 45 de tales fusocinas con GM-CSF incluyen IL-2 (Stagg y col., 2004), IL-15 (Rafei y col., 2007) e IL-21 (Williams y col., 2010a), también conocido como GIFT2, -15 y -21. Pueden esperarse efectos sinérgicos tanto a nivel de la señalización (es decir, efectos sinérgicos dentro de una célula diana) y a nivel celular (es decir, los efectos sinérgicos entre los diferentes tipos de células diana). Por ejemplo, GIFT2 indujo una activación más potente de las células NK en comparación con la combinación de citocinas sin fusionar (Penafuerte y col., 2009) y GIFT15 indujo una población de
- 50 células B con una potente supresión inmunitaria no anticipada (Rafei y col., 2009a). Asimismo, GIFT21 ejerció efectos proinflamatorios inesperados en las células monocíticas (Williams y col., 2010b). Otro ejemplo de una fusocina que combina citocinas helicoidales α es IL-2/IL-12 (Gillies y col., 2002; Jahn y col., 2012).

- Otra clase de fusocinas combina citocinas de diferentes familias estructurales. Los ejemplos incluyen la fusión de IL-
- 55 18 (un miembro de la familia de citocinas IL-1) e IL-2 (Ares y col., 2005) y la fusión entre IL-18 y EGF (factor de crecimiento epidérmico). Dado que frecuentemente se observa la sobreexpresión de EGFR en determinados tipos de células tumorales, la última fusocina ofrece la posibilidad de dirigir la actividad de IL-18 a las células tumorales EGFR+ (Lu y col., 2008). También se exploraron las fusiones entre las citocinas del haz α helicoidal y las quimiocinas más detalladamente. Las quimiocinas frecuentemente actúan utilizando gradientes de concentración para dirigir la
- 60 migración de células inmunitarias a sitios de infección e inflamación. Muchos receptores de quimiocinas muestran un patrón de expresión restringido que permite el direccionamiento a las células (inmunitarias) seleccionadas. Además, con señalización mediante serpentina, los receptores de quimiocina acoplados a la proteína G son básicamente

diferentes de las vías activadas por los complejos de receptores de citocina del haz α helicoidal y pueden esperarse mecanismos de comunicación cruzada positivos y negativos sinérgicos. Cabe destacar que las versiones truncas de extremo N diseñadas de quimiocinas pueden mantener sus propiedades de unión a los receptores pero mostrar un comportamiento antagónico. Un ejemplo es una fusocina entre GM-CSF y una CCL2 trunca en el extremo N que carece de los 5 primeros aminoácidos N terminales, también conocidos como GMME1 (Rafei y col., 2009b). Esta fusocina indujo la apoptosis de las células CCR2+ inflamatorias y los ratones tratados con GMME1 mostraron calificaciones menores en cuanto a enfermedades autoinmunitarias inducidas de forma experimental, inclusive EAE y CIA para esclerosis múltiple (Rafei y col., 2009b) y artritis reumatoide (Rafei y col., 2009c), respectivamente. Asimismo, esta fusocina indujo la apoptosis de las células tumorales CCR2+ (Rafei y col., 2011).

Sin embargo, las fusiones entre una citocina de tipo silvestre y una citocina mutante con una afinidad fuertemente reducida por su complejo de receptores cognados no se exploraron antes. La ventaja de esta estrategia es que se elimina la posible toxicidad sistémica de la citocina de tipo silvestre.

El documento WO 2008/124086 describe fusocinas para el tratamiento de ciertas enfermedades, *entre otras* que comprende una citocina TNF α 2a mutada.

Sorprendentemente, los investigadores descubrieron que tales fusocinas permiten el direccionamiento específico de la célula de las actividades de citocinas, por lo que dicha citocina mutante puede recuperar su actividad en las células diana, sin el efecto negativo de las citocinas de tipo silvestre. La aplicabilidad general del principio se ha demostrado utilizando tres fusocinas, cada una compuesta de dos citocinas de clases de citocinas estructuralmente diferentes, tal como se ejemplifica más adelante.

XCL1 / IFN α 2-mutante

XCL1 es una quimiocina de 93 aminoácidos secretada por células T CD8⁺, células T CD4⁺ polarizadas por células Th1 y células NK. Interactúa con XCR1, un receptor de quimiocina que se expresa exclusivamente mediante células dendríticas. En ratones, XCR1 se expresa en la gran mayoría de las células dendríticas CD11c⁺ CD8 α ⁺ esplénicas, mientras que solo un subconjunto muy pequeño de células dendríticas CD8 α ⁻ expresan este receptor (Dörner y col. 2009). XCR1 es un marcador selectivo conservado de células de mamífero (incluidas células humanas) homólogo a células de ratón CD8 α ⁺ dendríticas (Croizat y col. 2010). Curiosamente, se ha demostrado que la acción del interferón tipo I (IFN α /p) en este subconjunto de células dendríticas es fundamental para el reconocimiento inmunitario innato de un tumor que crece en ratones (Fuentes y col. 2011).

La terapia sistémica con IFN α tiene una toxicidad considerable, que incluye efectos secundarios como fatiga severa, fiebre, escalofríos, depresión, disfunción tiroidea, enfermedad de la retina, pérdida de cabello, piel seca, erupción cutánea, picazón y supresión de la médula ósea. Por tanto, valdría la pena direccionar la actividad IFN solo hacia la población celular que debe tratarse con IFN. Para la aplicación de tratamientos antitumorales, el direccionamiento de la población de células dendríticas que expresan XCR1 es altamente deseable dado que estas células se especializan en la presentación cruzada de antígenos (Bachem y col. 2012). Muchos datos experimentales sugieren que la población de células dendríticas que expresan XCR1 representa la población celular clave que debe reaccionar con el IFN tipo I en el microambiente del tumor para iniciar las respuestas inmunitarias que finalmente permitirán la destrucción del tumor y la inmunización (Gajewski y col. 2012).

El mutante humano IFN α 2-Q124R tiene una alta afinidad por la cadena de IFNAR1 murina y una baja afinidad por la cadena de IFNAR2 murina (Weber y col., 1987). Muestra una actividad muy baja en las células murinas y, por lo tanto, representa un prototipo de un subtipo de IFN de tipo I diseñado para dirigirse a la actividad de IFN en células de ratón seleccionadas (PCT/EP2013/050787).

CCL20 / IL 1 β

La quimiocina CC CCL20, también conocida como quimiocina hepática y regulada por activación (LARC), proteína inflamatoria macrófaga-3 α (MIP-3 α) o Exodus-1 es una proteína 96 AA que se expresa predominantemente en el hígado y el tejido linfático (Hieshima y col., 1997). Tras la secreción, CCL20 ejerce su actividad al unirse al receptor 6 de la quimiocina CC (CCR6), que pertenece a la familia del receptor 1 acoplado a la proteína G (GPCR) (Baba y col., 1997). La expresión de CCR6 se informa en diferentes subconjuntos de leucocitos pero se documenta mejor con la población de células Th17 (Singh y col., 2008). La función normal de Th17 es indispensable para la inmunidad protectora contra una variedad de patógenos, inclusive *Mycobacterium tuberculosis* (Khader y col., 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Ye y col., 2001) y *Bordetella pertussis* (Higgins y col., 2006).

Los efectos potenciadores de IL-1 β en la expansión y diferenciación de diferentes subconjuntos de células T, en particular células Th17 (Sutton y col., 2006; Acosta-Rodriguez y col., 2007; Dunne y col., 2010; Shaw y col., 2012) se

han establecido firmemente. Entre los subconjuntos de células T, las células Th17 expresan los niveles más altos de IL-1R e IL-1 juega un papel importante en la preparación de Th17. La actividad de IL-1 agonista controlada puede tener por lo tanto aplicaciones en diferentes procedimientos 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. Por lo tanto, cuando la acción de IL-1 puede restringirse a una población celular seleccionada, el problema de la toxicidad puede resolverse, lo que abre las perspectivas terapéuticas, por ejemplo, para su uso como adyuvante de células T para mejorar la respuesta a vacunas débiles (Ben-Sasson y col., 2011). Para direccionar de forma específica las mutaciones de IL-1 hacia la población celular Th17, se utilizan las variantes de IL-1 que consisten en IL-1 mutante fusionada con un resto de direccionamiento a CCL20. Dado que se restringirá la activación únicamente a las células que expresan CCR6 (es decir, las células Th17), no se espera una toxicidad sistémica significativa.

TNFα / leptina mutante

TNFα es una citocina con una amplia gama de actividades biológicas, inclusive la citotoxicidad, la regulación de las células inmunitarias y la mediación de las respuestas inflamatorias. Es una proteína de transmembrana de tipo II homotrimérica, que no se une de forma covalente y que se ensambla por sí misma de 233 aminoácidos. TNFα se encuentra activa como proteína de unión a la membrana así como una proteína soluble, liberada de la membrana celular después de la escisión proteolítica de los 76 aminoácidos aminoterminales (secuencia previa) por la enzima de conversión de TNFα (TACE, a la que también se denomina ADAM17). Señala a través de 2 receptores diferentes, TNF-R1 (p55) y TNF-R2 (p75), ambas glicoproteínas de transmembrana con un motivo rico en cisteína en el dominio extracelular de unión al ligando. A pesar de la homología extracelular, tienen diferentes dominios intracelulares y por tanto señalan actividades de TNF diferentes (Hehlhans & Pfeffer, 2005). Los investigadores generaron una variante de cadena simple (scTNF) que consiste en tres monómeros de TNF acoplados mediante enlazadores GGGGS, tal como describieron anteriormente Boschert y col., 2010.

La leptina es una citocina adipocítica de 16kDa involucrada en una multitud de procesos biológicos, que incluyen inmunidad, reproducción, crecimiento lineal, homeostasis de glucosa, metabolismo óseo y oxidación de grasas, pero es mejor conocida por su efecto drástico como señal de saciedad (Halaas y col., 1995). Dado su efecto en las células inmunitarias, la leptina también se encuentra implicada en varias enfermedades autoinmunitarias (Iikuni y col., 2008). El direccionamiento selectivo de la actividad de la leptina puede ser beneficioso tanto para los trastornos metabólicos como para los inmunitarios (o inflamatorios).

Un primer aspecto de la invención es una proteína de fusión, que comprende al menos dos citocinas que comprenden XCL1 e IFNα2, de las cuales IFNα2 tiene una mutación que reduce fuertemente la actividad de unión a su receptor, y al menos una citocina es una citocina de tipo silvestre que proporciona un direccionamiento específico de células que restaura la actividad de IFNα2 en las células diana. Una afinidad de unión reducida, como se utiliza en este caso, significa que la afinidad es menor que 50 %, preferentemente menor que 40 %, más preferentemente menor que 30 %, más preferentemente menor que 25 %, más preferentemente menor que 20 %, más preferentemente menor que 15 %, más preferentemente menor que 10 %, más preferentemente menor que 5 %, lo más preferentemente, menor que 1 % de la citocina de tipo silvestre. "Citocina de tipo silvestre", como se utiliza en este caso, significa citocina tal como se da en la naturaleza, en el organismo huésped. La modificación de la citocina que tiene como resultado la reducción de la afinidad de unión puede ser una modificación que disminuye la actividad de la citocina de tipo salvaje normal o puede ser una modificación que aumenta la afinidad de una citocina no endógena homóloga (tal como, de modo no taxativo, citocina de ratón, que se une a un receptor de citocina humana). Las modificaciones pueden ser cualquier modificación que reduzca o aumente la actividad, conocida para los expertos en la materia, inclusive, pero sin limitarse a, modificaciones químicas y/o enzimáticas como pegilación y glicosilación, fusión con otras proteínas y mutaciones. Preferentemente, la citocina con afinidad de unión reducida al receptor es una citocina mutada. La mutación puede ser cualquier mutación conocida para el experto en la materia, inclusive eliminaciones, inserciones, truncamientos o mutaciones puntuales. Preferentemente, dicha mutación es una mutación puntual o una combinación de mutaciones puntuales. La afinidad se puede medir con cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. Como ejemplo no limitante, la afinidad del ligando hacia el receptor puede medirse mediante el análisis de gráfica de Scatchard y ajustes informáticos de los datos de unión (por ejemplo, Scatchard, 1949) o mediante espectroscopía de interferencia reflectométrica en condiciones de flujo continuo, como se describe en Brecht y col. (1993).

Como alternativa, la actividad de unión reducida puede medirse como una reducción de la actividad biológica del ligando mutante en comparación con el ligando de tipo silvestre. En una realización preferida, dicha actividad biológica se mide in vitro, utilizando un ensayo indicador. Dichos ensayos informadores dependen del sistema receptor de citocina utilizado, y son conocidos por el experto en la materia. Como un ejemplo no limitante, Bono y col (1989) describen un ensayo de indicador IFN-γ junto con el análisis Scatchard. Preferentemente, la actividad biológica del mutante es menor que 50 %, preferentemente menor que 40 %, más preferentemente menor que 30 %, más preferentemente menor que 25 %, más preferentemente menor que 20 %, más preferentemente menor que 15 %, más preferentemente menor que 10 %, más preferentemente menor que 5 %, lo más preferentemente, menor que 1 % de la citocina de tipo silvestre.

más preferentemente menor que 10 %, más preferentemente menor que 5 %, lo más preferentemente, menor que 1 % de la citocina de tipo silvestre

La citocina modificada se fusiona con otra citocina, modificada o no. Preferentemente, ambas citocinas se fusionan utilizando una secuencia de enlace, preferentemente un enlazador GGS, que comprende una o más repeticiones GGS. La citocina modificada puede colocarse en la parte aminoterminal de la molécula o en la parte carboxiterminal; la proteína de fusión puede comprender además otros dominios tales como, pero sin limitarse a, una secuencia de etiquetas, una secuencia de señales, otra citocina o un anticuerpo.

En una realización preferida, dicha proteína de fusión es una fusión entre XCL1 y un mutante IFN α 2, preferentemente un mutante Q124R.

Otro aspecto de la invención es una proteína de fusión según la invención para su uso como medicamento. En una modalidad preferida, es una proteína de fusión según la invención para su uso como tratamiento contra el cáncer. En otra realización preferida, es una proteína de fusión según la invención para su uso en la modulación de la respuesta inmunitaria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de los elementos estructurales en la proteína de fusión XCL1/IFN α 2-Q124R.

Figura 2: Actividad selectiva de la proteína de fusión XCL1/IFN α 2-Q124R en las células que expresan XCR1. La fosforilación de STAT1 Y701 se mide en respuesta a IFN α /β o la proteína de fusión XCL1/IFN α 2-Q124R en diferentes subconjuntos de esplenocitos de ratón, que se caracterizan por la expresión de CD11c y CD8 α . Primera columna: subconjunto CD11c⁻ CD8 α ⁺; segunda columna: subconjunto CD11c⁻ CD8 α ⁻; tercera columna: subconjunto CD11c^{medi} CD8 α ⁻; cuarta columna: subconjunto CD11c^{alt} CD8 α ⁺; quinta columna: subconjunto CD11c^{alt} CD8 α ⁻.

Figura 3: Representación esquemática de los elementos estructurales en las proteínas de fusión de la mutación de IL-1B/CCL20.

Figura 4: Actividad selectiva de las proteínas de fusión de IL-1β-mutante/CCL20 en células que expresan CCR6.

(A) inducción de la actividad de NFκB por el tipo silvestre y 5 mutantes diferentes de IL-1β, fusionados a CCL20.
(B) dependencia de la concentración de la inducción de la actividad de NFκB mediante proteínas de fusión de tipo silvestre e IL-1β Q148G/CCL20, en células con transfección simulada o células transfectadas con CCR6.
(C) inducción de la actividad de NFκB mediante proteínas de fusión de tipo silvestre e IL-1β Q148G mutante/CCL20 (12,5 ng/ml), en células con transfección simulada o células transfectadas con CCR6, en comparación con la inducción por vehículo.

Figura 5: Representación esquemática de los elementos estructurales en las proteínas de fusión scTNFα/leptina mutante.

Figura 6: Actividad selectiva de las proteínas de fusión scTNFα/leptina mutante en las células que expresan el receptor de leptina. Se mide el crecimiento que depende de la leptina inducido por las concentraciones indicadas de WT con direccionamiento a scTNF o leptina mutante mediante el ensayo XTT en células Ba/F3-mLR (panel A) o células Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt(panel B).

Figura 7: Direccionamiento in vivo de la actividad IFN en células de bazo de ratón que expresan XCR1. Se inyectaron iv los ratones C57Bl/6 con la cantidad indicada de XCL1-IFN α 2-Q124R o con 1 000 000 unidades de IFN α /β oPBS murino natural. Después de 45 min, se analizaron las células del bazo mediante FACS en busca de la expresión de CD11c y CD8 α (primer panel) y en busca de P-STAT1 (paneles adicionales) en la siguiente población celular: CD11c⁻ CD8 α ⁻ (línea 1), CD11c⁻ CD8 α ⁺ (línea 2), CD11c⁺ CD8 α ⁺ (línea 3), CD11c⁺ CD8 α ⁻ (línea 4).

EJEMPLOS

Los ejemplos que no pertenecen al alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

Materiales y procedimientos para los ejemplos

Clonación y producción de las fusocinas.

Clonación de la proteína de fusión XCL1 / IFN α 2-Q124R.

El marco de lectura abierto XCL1 se sintetizó por PCR a partir del plásmido codificador XCL1 MR200473 (Origen Inc.), utilizando el sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche Diagnostics) y los siguientes cebadores:

5 Directo: 5'GGGGGGGAATTCATGAGACTTCTCCTCCTGAC3'

Inverso: 5' GGGGGGTCCGGAGGCCAGTCAGGGTTATCGCTG3'

El producto de PCR fue digerido por EcoRI y BspEI y sustituido por el fragmento EcoRI-BspEI que codifica el
10 nanocuerpo en el vector pMET7 SigK-HA-1R59B-His-PAS-ybbr-IFN α 2-Q124R (PCT/EP2013/050787).

Producción de la proteína de fusión XCL1 / IFN α 2-Q124R.

Las células Hek 293T se transfectaron con la construcción de fusión de proteínas usando el procedimiento estándar
15 de lipofectamina (Invitrogen). 48 horas después de la transfección, el medio de cultivo se recogió y se almacenó a -20 °C. La actividad de IFN se ensayó en las líneas celulares HL116 humana y LL171 murina como se describe (Uze y col. J. Mol. Biol. 1994) utilizando la preparación purificada de Nanobody GFP-IFN α 2-Q124R (descrita en PCT/EP2013/050787) como estándar.

20 Clonación de las proteínas de fusión IL-1 β / CCL20.

Se generó una secuencia de codón optimizado que codifica la proteína de fusión IL-1 β /CCL20 humana madura mediante síntesis génica (Invitrogen Gene Art). En resumen, se sintetizó una secuencia en la cual la proteína madura
25 IL-1 humana, precedida del péptido líder SigK y equipada con un HA N terminal, se fusionó en su extremo C con una secuencia de enlace 13xGGS, seguido por la secuencia para CCL20 humana madura con una etiqueta HIS C terminal (Figura 3).

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

	Cebador directo	Cebador inverso
R120G	GCGGCAGCGCCCCTGTCGGAAGCTTGAAGTGCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAGGGGC GCTGCCGC
Q131G	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTCATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTCTTCCCTGGCTGTCCC GCAG
H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTGCCTTCA GCTCG
Q148G	GAAGGCACTGCATCTGGGTGGCCAGGACATGGAACAGC	GCTGTTCCATGTCCTGGCCACCCAGATGCAGTG CCTTC
K209A	CCCCAAGAACTACCCCAAGGCAAAGATGGAAAAGCGCT TCGTGTTCAAC	GTTGAACACGAAGCGCTTTTCATCTTTGCCTT GGGGTAGTTCTTGGGG

Producción de las proteínas de fusión IL-1 β -mutante:CCL20.

35 Las proteínas de fusión IL-1 β -CCL20 se produjeron 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 %. Después de 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo con medio con poco suero (DMEM/FCS al 5 %) y las células se transfectaron utilizando PEI lineal. En resumen, se preparó la mezcla de transfección PEI al combinar
40 1 μ g de vector de expresión con 5 μ g PEI in 160 μ l DMEM, se incubó durante 10 minutos a TA y se agregó a los pocillos gota a gota. Después 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 en los medios acondicionados se determinó por Elisa según las instrucciones del fabricante (R & D Systems).

Clonación de las proteínas de fusión scTNF / leptina.

Las secuencias de codificación de la leptina de tipo silvestre (WT), L86S y L86N se sintetizaron por PCR a partir de
5 plásmidos pMet7 que expresan leptina WT, leptina L86S o leptina L86N, respectivamente, usando los siguientes cebadores:

directo 5'-GCAGATCTGTGACATCCAGAAAGTCCAGGATGACACC-3 ',

10 inverso 5'-CGATGCGGCCGCACATTCAGGGCTAACATCCAACGT-3 '.

Esto introduce un sitio BglII y un sitio NotI en el extremo amino y carboxilo, respectivamente, de la secuencia de
codificación de leptina. El producto de la PCR se digirió con BglII y NotI y se clonó en pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-
6xGGG-FLAG (WT scTNF se generó mediante síntesis génica, GeneArt) se abrió con BglII y NotI, que se encuentra
15 entre 6xGGG y FLAG. Esto generó pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-6xGGG-mLeptin-FLAG, pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-
6xGGG-mLeptin L86S-FLAG y pMET7-SlgK-HA-scTNF WT-6xGGG-mLeptin L86N-FLAG.

Producción de las proteínas de fusión scTNF / leptina.

20 Las células HekT se transfectaron con las diferentes construcciones de proteínas de fusión usando el procedimiento
estándar de precipitación con fosfato de calcio. 48 horas después de la transfección, se recogieron los medios de
cultivo y se almacenaron a -20 °C. La concentración se determinó con un ELISA hTNFa que se encuentra en el
mercado (DY210, R&D systems).

25 Líneas celulares

Las líneas celulares Hek 293T, HL116 y LL171 se cultivaron en DMEM complementado con FCS al 10 %. Se
mantuvieron las células Ba/F3-mLR y Ba/F3-mL_R-TNFR1 ACyt en RPMI complementado con FCS inactivado por
calor al 10 % y 100 ng/ml de leptina.

30

Ensayos**Ensayo fosfo STAT1.**

35 Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de bazo aislados de ratones C57Bl/6. Se eliminaron los
eritrocitos utilizando una solución tamponada de lisis de glóbulos rojos (Lonza). Se trataron los esplenocitos durante
30 min con IFN α /β de ratón o proteína de fusión XCL1-IFN α 2-Q124R en RPMI al 5 %, suero fetal bovino a 37 °C y
luego se etiquetó con anti-STAT1 de ratón BD Phosflow PE (pY701) junto con CD11c antirratón etiquetado con Alexa
Fluor 488 (eBioscience n.º 53-0114-80) y CD8 α antirratón etiquetado con APC (BD Bioscience #553035) o CD11c
40 antirratón y CD8 α antirratón etiquetado con Alexa 488 según las instrucciones de BD Biosciences. Se adquirieron los
datos FACS utilizando BD FACS Canto y se analizó utilizando el software Diva (BD Biosciences).

Ensayo del gen reportero de NF- κ B.

45 Para evaluar la activación de IL-1R, los investigadores utilizaron células HEK-Blue™ IL-1β que expresan de manera
estable el IL-1R (Invivogen) y las transfectaron transitoriamente con un gen reportero de luciferasa NF- κ B. En resumen,
se sembraron células HEK-Blue™ IL-13 en medio de cultivo (DMEM/FCS al 10 %) en placas de 96 pocillos (10 000
células/pocillo) y se transfectaron al día siguiente utilizando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio con
las cantidades indicadas de plásmidos de expresión y 5 ng/pocillo del plásmido de gen reportero 3kB-Luc (Vanden
50 Berghe y col., 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 IL1-
CCL20. 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.

55 Ensayo de proliferación celular.

La línea celular Ba/F3-mLR se generó por electroporación de células Ba/F3 con el vector pMet7-mLR. Se
seleccionaron las células de expresión estable al cultivarlas en leptina en lugar de IL-3. Ciertamente, el cultivo de las
células Ba/F3 depende de IL-3, pero cuando expresan mLR, también proliferan con leptina. Para obtener la línea
60 celular Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt, las células Ba/F3-mLR se cotransfectaron con pMet7-HA-hTNFR1ΔCyt y pIRESpuro2
(Clontech) seguido de selección de puromicina y clasificación FACS de células que expresan hTNFR1ΔCyt.

Para evaluar la proliferación celular, se lavaron células Ba/F3-mLR y Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt, se sembraron en RPMI/iFCS al 10 % en placas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se estimularon con las cantidades indicadas de leptina o proteínas de fusión. Cuatro días después, se añadieron 50 µl XTT (XTT Cell Proliferation Kit II, Roche, 11 465 015 001) y se incubaron durante 4 horas antes de medir la absorbancia a 450 nm.

5

Ejemplo 1: La actividad de IFN de la proteína de fusión XCL1/IFNα2-Q124R se restaura en las células que expresan XCR1.

Los esplenocitos de ratón se trataron durante 30 minutos con XCL1-IFNα2-Q124R 1 nM o con 10000 unidades/ml de IFNα/β de ratón. Luego se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con un antifosfo STAT1 (PE), anti CD11c (Alexa Fluor 488) y anti CD8α (APC) y se analizaron mediante FACS. La figura 2 muestra que el IFN α/β de ratón indujo la fosforilación STAT1 en todos los subconjuntos de esplenocitos analizados. En contraste, la proteína de fusión XCL1-IFNα2-Q124R indujo una respuesta de IFN solo en la mayoría de las células que pertenecen al subconjunto CD11c⁺ CD8α⁺ y en una minoría de células pertenecientes al subconjunto CD11c⁺ CD8α⁻. La distribución de los subconjuntos de esplenocitos que responden a la proteína de fusión XCL1-IFNα2-Q124R coincide perfectamente con la distribución esperada de XCR1, el receptor de XCL1 (Dorner y col. 2009).

10

15

Ejemplo 2: La actividad de IL1B se restaura en las células que expresan CCR6

Las células HEK-Blue™ IL-1β, que expresan establemente la IL-1R, se transfectaron transitoriamente con un plásmido de gen reportero NF-κB (5 ng/pocillo) y un vector vacío o plásmido de expresión hCCR6 (10 ng/pocillo). Las células simuladas y transfectadas CCR6 se trataron luego durante 6 horas con las proteínas de fusión de tipo silvestre o mutante IL1β-CCL20 (25 ng/ml), después de lo cual se lisaron las células y se determinó la actividad del gen reportero de NF-κB. Tal como resulta evidente en la figura 4A, las células que expresan CCR6 respondieron con un aumento en la actividad del gen reportero de NF-κB a todas las proteínas de fusión mutantes IL1β-CCL20 investigadas, en comparación con las células de transfección simulada. Para evaluar el efecto del mutante IL-1β- Q148G, para la cual el efecto de direccionamiento fue más evidente, más detalladamente, se trataron las células HEK-Blue™ IL-1β con transfección simulada o que expresan CCR6 durante 6 horas con dosis en aumento de IL-1β WT o la proteína de fusión IL-1βQ148G-CCL20. La figura 4B demuestra que la sobreexpresión de CCR6 aumentó la actividad de la fusión IL-1β-CCL20 WT, pero tuvo un efecto potenciador más fuerte para la fusión IL-1βQ148G-CCL20. El efecto de direccionamiento fue más notorio cuando se aplicó IL-1β-CCL20 a las células a 12,5 ng/ml (Figura 4C).

20

25

30

Ejemplo 3: La actividad de la leptina se restaura en células que expresan TNFR

Se evaluó la proliferación de células Ba/F3-mLR y Ba/F3-mLR-TNFR1ΔCyt después de 4 días de estimulación con las cantidades indicadas de leptina o las proteínas de fusión leptina-scTNF. Tal como se muestra en la figura 6A, ninguna de las líneas celulares prolifera en el medio de cultivo complementado únicamente con suero inactivado por calor. Además, la capacidad de la leptina de inducir la proliferación Ba/F3 se reduce cuando se acopla a scTNF. La mutación de L86 dentro de la leptina WT en una serina (L86S) o una asparagina (L86N) tiene como resultado una disminución moderada o potente de la afinidad hacia el receptor de leptina de ratón, respectivamente. Esta disminución en la afinidad se traduce en una inducción de 3 frente a 10 veces menos potente de la proliferación de las células Ba/F3-mLR para la leptina L86S frente a L86N, respectivamente. La transfección adicional de las células Ba/F3-mLR con TNF-R1 humano que carece de su dominio intracelular (hTNFR1 ΔCyt) introduce un receptor no funcional, que puede funcionar como un marcador extracelular de unión a la membrana. Claramente, la respuesta proliferativa tras la estimulación con los mutantes de leptina L86S y L86N acopladas a scTNF se restaura completamente en las células Ba/F3-mLR que expresan hTNFR1ΔCyt (Figura 6B).

35

40

45

Ejemplo 4: direccionamiento in vivo de una población celular que expresa XCR1

Según Bachem y col. (Frontiers in Immunology 3, 1-12. 2012), as células que expresan XCR1 representan la mayor parte de la población de células de bazo CD11c⁺ CD8α⁺ y una parte menor de la población de células de bazo CD11c⁺ CD8α⁻. Se inyectaron iv ratones C57Bl/6 con la cantidad indicada de XCL1-IFNα2-Q124R o con 1 000 000 unidades de IFNα/β oPBS murino natural. Después de 45 min, se analizaron las células del bazo mediante FACS para determinar P-STAT1 en las siguientes poblaciones celulares: CD11c-CD8α⁻, CD11c- CD8α⁺, CD11c⁺ CD8α⁺, CD11c⁺ CD8α⁻. Los resultados se muestran en la figura 7. A partir de estos resultados, resulta evidente que la construcción de fusión puede dirigir e inducir una respuesta en una fracción menor de la población (aproximadamente 0,1 % de las células totales), mientras que las células sensibles a IFN que no expresan el marcador no se ven afectadas. Ciertamente, IFN de tipo silvestre también afecta las células CD11c⁺ CD8α⁻, mientras que aquellas células no se ven afectadas por la construcción de fusión, lo que claramente proporciona la acción específica de la fusión.

50

55

60

REFERENCIAS

- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A and Sallusto F. (2007) Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 8, 942-9.
- Acres B, Gantzer M, Remy C, Futin N, Accart N, Chaloin O, Hoebeke J, Balloul JM and Paul S. (2005). Fusokine
5 interleukin-2/interleukin-18, a novel potent innate and adaptive immune stimulator with decreased toxicity. *Cancer Res.* 65, 9536-46.
- Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiyama H and Yoshie O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem.* 272, 14893-8.
- Bachem A, Hartung E, Güttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, Plantinga M, Mazzini E, Stoitzner P, Gurka S, Henn
10 V, Mages HW and Kroczeck RA. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 3, 214. doi: 10.3389.
- Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Hu-Li J and Paul WE. (2011). IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine*, 56, 122-5.
- Bono MR, Benech P, Coullin P, Alcaide-Loridan C, Grisard MC, Join H, Fischer DG and Fellous M. (1989).
15 Characterization of human IFN- γ response using somatic cell hybrids of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Somat. Cell Mol. Genet.* 15, 513-23.
- 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.
- Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, Vu Manh TP, Baranek T, Storset AK, Marvel J,
20 Boudinot P, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I and Dalod M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1283-1292.
- Donahue RE, Seehra J, Metzger M, Lefebvre D, Rock B, Carbone S, Nathan DG, Garnick M, Sehgal PK, Laston D, et al. (1988). Human IL-3 and GM-CSF act synergistically in stimulating hematopoiesis in primates. *Science* 241, 1820-1823
- Dörner BG, Dörner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, Jack RS, Henn V and Kroczeck RA. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* 31, 823-833.
- Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P and Mills KH. (2010) Inflammation activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*.
30 *J Immunol.* 185, 1711-9.
- Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM and Gajewski TF (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells *J. Exp. Med.* 208, 2005-2016.
- Gaffen SL. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 23, 613-9.
- Gajewski TF, Fuertes MB and Woo SR (2012). Innate immune sensing of cancer: clues from an identified role for type
35 I IFNs. *Cancer Immunol Immunother.* 61, 1343-7.
- Gillies SD, Lan Y, Brunkhorst B, Wong WK, Li Y, Lo KM. (2002). Bi-functional cytokine fusion proteins for gene therapy and antibody-targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 51, 449-460
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK and Friedman JM. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-6.
- Hehlhans, T and Pfeffer, K (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 115, 1-20.
- Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O and Nomiyama H. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem.*
45 272, 5846-53.
- Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC and Mills KH. (2006). TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol.* 177, 7980-9.
- Idriss HT & Naismith JH (2000). TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique* 50, 184-95.
- Iikuni N, Lam QL, Lu L, Matarese G, La Cava A. (2008). Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev.* 4, 70-79.
- Jahn T, Zuther M, Friedrichs B, Heuser C, Gohlke S, Abken H, Hombach AA (2012). An IL12-IL2-antibody fusion protein targeting Hodgkin's lymphoma cells potentiates activation of NK and T cells for an anti-tumor attack. *PLoS One* 7:e44482.
- Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL,
55 Locksley RM, Haynes L, Randall TD and 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.* 8, 369-77.
- Krippner-Heidenreich A, Grunwald I, Zimmermann G, Kühnle M, Gerspach J, Sterns T, Shnyder SD, Gill JH, Männel DN, Pfizenmaier K and Scheurich P. (2008). Single-chain TNF, a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral
60 activity. *J Immunol.* 180, 8176-83.
- Lu J, Peng Y, Zheng ZJ, Pan JH, Zhang Y, Bai Y (2008). EGF-IL-18 fusion protein as a potential anti-tumor reagent by induction of immune response and apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett* 260, 187-197.

- Murzin AG, Lesk AM & Chothia C (1992). β -Trefoil fold: Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *Journal of Molecular Biology* 223, 531-543.
- Nicola NA & Hilton DJ (1998). General classes and functions of four-helix bundle cytokines. *Advances in protein chemistry* 52, 1-65.
- 5 - Nomiyama H, Osada N and Yoshie O. (2013). Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells*. 18,1-16.
- O'Shaughnessy JA, Tolcher A, Riseberg D, Venzon D, Zujewski J, Noone M, Gossard M, Danforth D, Jacobson J, Chang V, Goldspiel B, Keegan P, Giusti R and Cowan KH. (1996). Prospective, randomized trial of 5-fluorouracil, leucovorin, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in combination with the interleukin-3/granulocyte-
- 10 macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) fusion protein (PIXY321) versus GM-CSF in patients with advanced breast cancer. *Blood* 87, 2205-2211
- Penafuerte C, Bautista-Lopez N, Boulassel MR, Routy JP and Galipeau J (2009). The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation. *Cancer Res* 69, 9020-9028
- 15 - Rafei M, Wu JH, Annabi B, Lejeune L, François M and Galipeau J (2007). A GMCSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex. *Blood* 109, 2234-2242
- Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, Li M, Forner K, Birman E, Boivin MN, Young YK, Perreault C and Galipeau J. (2009a). A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population
- 20 with immune suppressive properties. *Nat Med* 15, 1038-1045
- Rafei M, Campeau PM, Wu JH, Birman E, Forner K, Boivin MN and Galipeau J. (2009b) Selective inhibition of CCR2 expressing lymphomyeloid cells in experimental autoimmune encephalomyelitis by a GM-CSF-MCP1 fusokine. *J Immunol*. 182, 2620-7.
- Rafei M, Berchiche YA, Birman E, Boivin MN, Young YK, Wu JH, Heveker N, and Galipeau J. (2009c) An engineered
- 25 GM-CSF-CCL2 fusokine is a potent inhibitor of CCR2-driven inflammation as demonstrated in a murine model of inflammatory arthritis. *J Immunol*. 183, 1759-66.
- Rafei M, Deng J, Boivin MN, Williams P, Matulis SM, Yuan S, Birman E, Forner K, Yuan L, Castellino C, Boise LH, MacDonald TJ and Galipeau J. (2011) A MCP1 fusokine with CCR2-specific tumoricidal activity. *Mol Cancer*. 10:121. doi: 10.1186/1476-4598-10-121.
- 30 - Shaw MH, Kamada N, Kim YG and Núñez G. (2012) Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med*. 209, 251-8.
- Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN and Farber JM. (2008) Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol*. 180, 214-21.
- Scatchard G. (1949). *Ann New York Acad Sci* 51, 660-72.
- 35 - Stagg J, Wu JH, Bouganis N and Galipeau J. (2004). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion cDNA for cancer gene immunotherapy. *Cancer Res* 64, 8795-8799
- Sun PD & Davies DR. (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 24, 269-91.
- Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH and Lavelle EC. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction
- 40 of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 203, 1685-91.
- Weber H, Valenzuela D, Lujber G, Gubler M and Weissmann C. (1987). Single amino acid changes that render human IFN-alpha 2 biologically active on mouse cells. *EMBO J*. 6, 591-8.
- Williams P, Bouchentouf M, Rafei M, Romieu-Mourez R, Hsieh J, Boivin MN, Yuan S, Forner KA, Birman E and Galipeau J. (2010a). A dendritic cell population generated by a fusion of GM-CSF and IL-21 induces tumor-antigen-
- 45 specific immunity. *J Immunol*. 185, 7358-66.
- Williams P, Rafei M, Bouchentouf M, Raven J, Yuan S, Cuerquis J, Forner KA, Birman E and Galipeau J. (2010b). A fusion of GMCSF and IL-21 initiates hypersignaling through the IL-21 Ralpha chain with immune activating and tumoricidal effects in vivo. *Mol Ther* 18, 1293-1301.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J,
- 50 Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ and 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> FUSOCINAS QUE IMPLICAN CITOCINAS CON AFINIDADES DE UNIÓN AL RECEPTOR FUERTEMENTE REDUCIDAS
10 <130> 237-017T1

<140> Documento EP 14 734 831.2
<141> 03/07/2014
15 <150> PCT/EP2014/064227
<151> 03/07/2014

<150> Documento EP 13306034.3
20 <151> 18/07/2013

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5
25 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Enlazador

<400> 1
35

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5

<210> 2
<211> 32
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
45

No se encontraron entradas de tabla de contenido.
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador

<400> 3

55 ggggggtccg gagggccagt cagggttata gctg 34

<210> 4
<211> 39
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

5 **No se encontraron entradas de tabla de contenido.**

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 5

ctgcgggaca gccaggggaa gagcctgggc atgagcg

37

15

<210> 6
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Cebador

No se encontraron entradas de tabla de contenido.

25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

30

<400> 7

gaaggcactg catctgggtg gccaggacat ggaacagc

38

35 <210> 8

<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador

No se encontraron entradas de tabla de contenido.

<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Cebador

<400> 9

50

gcagggtgca gttcaagctt cccagagggg cgctgccgc

39

<210> 10
<211> 37

55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

60

<400> 10

	cgctcatgac caggctcttc ccctggctgt cccgcag	37
	<210> 11	
5	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador	
	<400> 11	
	ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg	38
15	<210> 12	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador	
	No se encontraron entradas de tabla de contenido.	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	No se encontraron entradas de tabla de contenido.	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	No se encontraron entradas de tabla de contenido.	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
45	<400>	
	cgatggggcc gcacattcag ggctaacatc caactgt	37 15

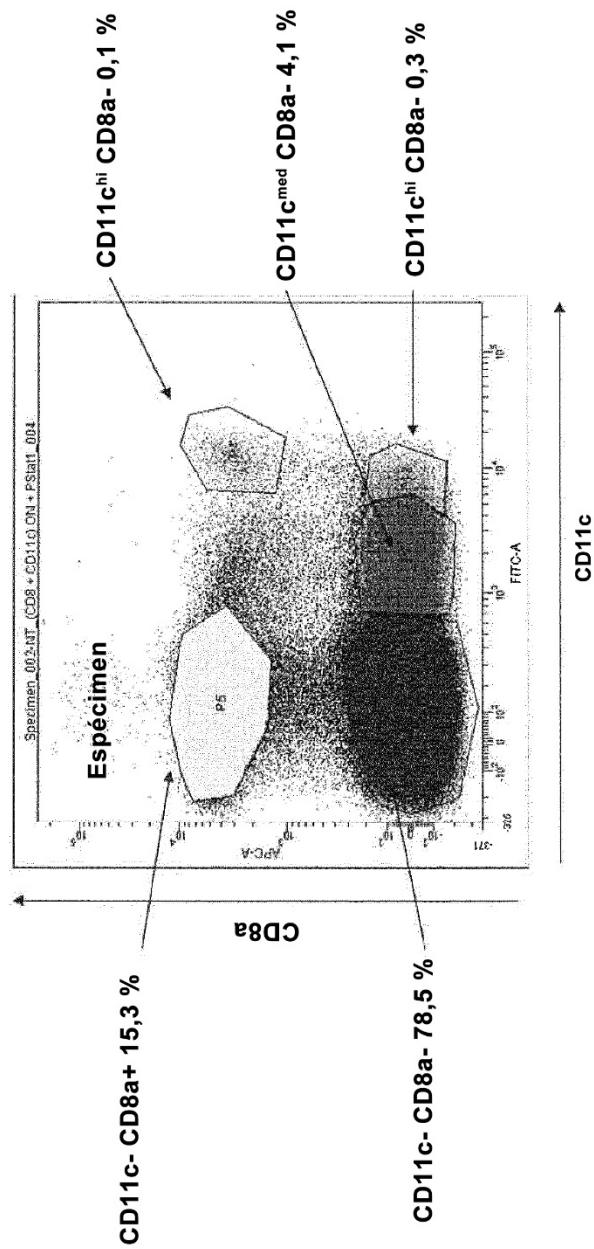
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una proteína de fusión que comprende al menos dos citocinas,
5 donde las citocinas son XCL1 e IFN α 2, y
donde IFN α 2 comprende una mutación que reduce fuertemente la actividad de unión a su receptor, y al menos una
citocina es una citocina de tipo silvestre que proporciona un direccionamiento específico de células que restaura la
actividad de IFN α 2 en las células diana.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, que comprende además un enlazador GGS.
3. La composición de la reivindicación 1, donde la mutación es Q124R.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el XCL1 es de tipo silvestre.
- 15 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 20 7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1- 4 para su uso en la modulación de la
respuesta inmune.

Figura 1

XCL1 líder	XCL1	etiqueta His	etiqueta PAS	etiqueta ybbR	IFN α 2-Q124R
---------------	------	-----------------	-----------------	------------------	----------------------

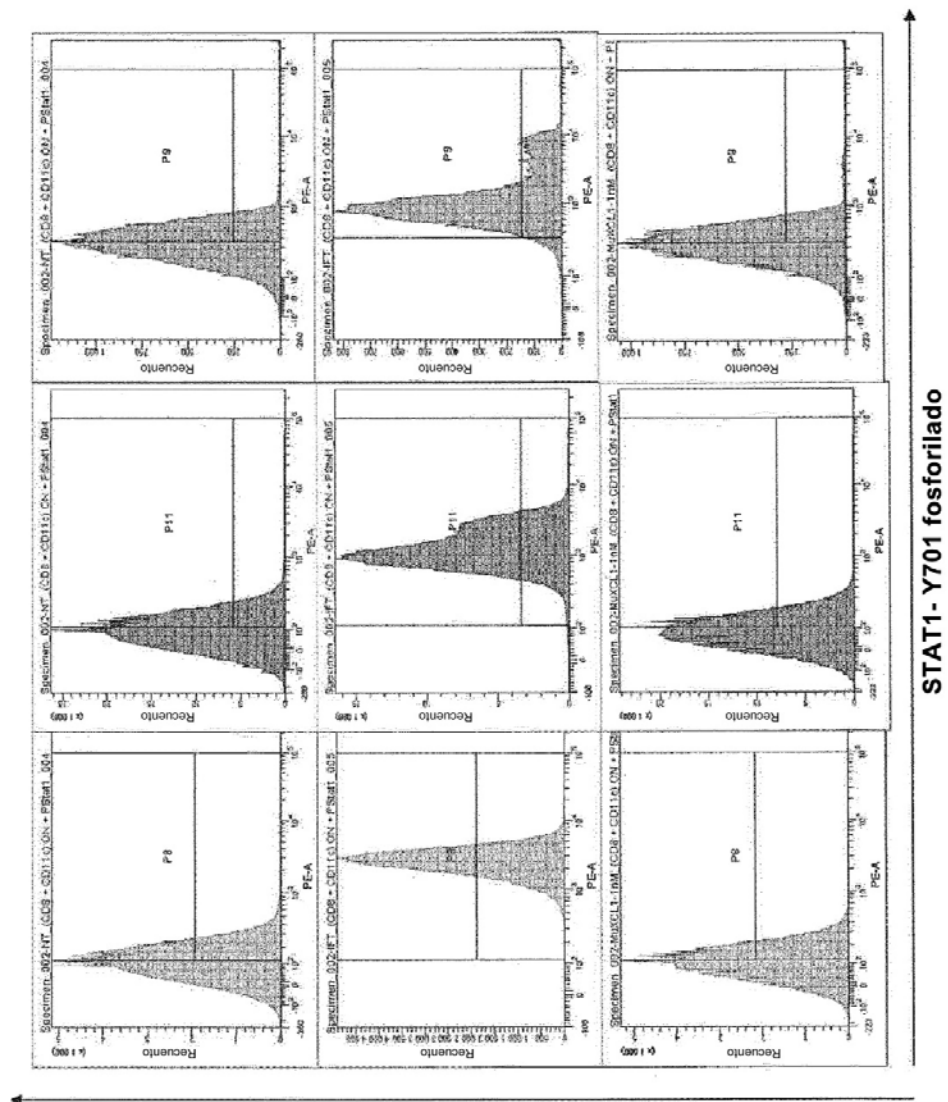
Figura 2



no tratado

IFN a/b

XCL1-IFNa2-Q124R



STAT1- Y701 fosforilado

Continuación de la figura 2

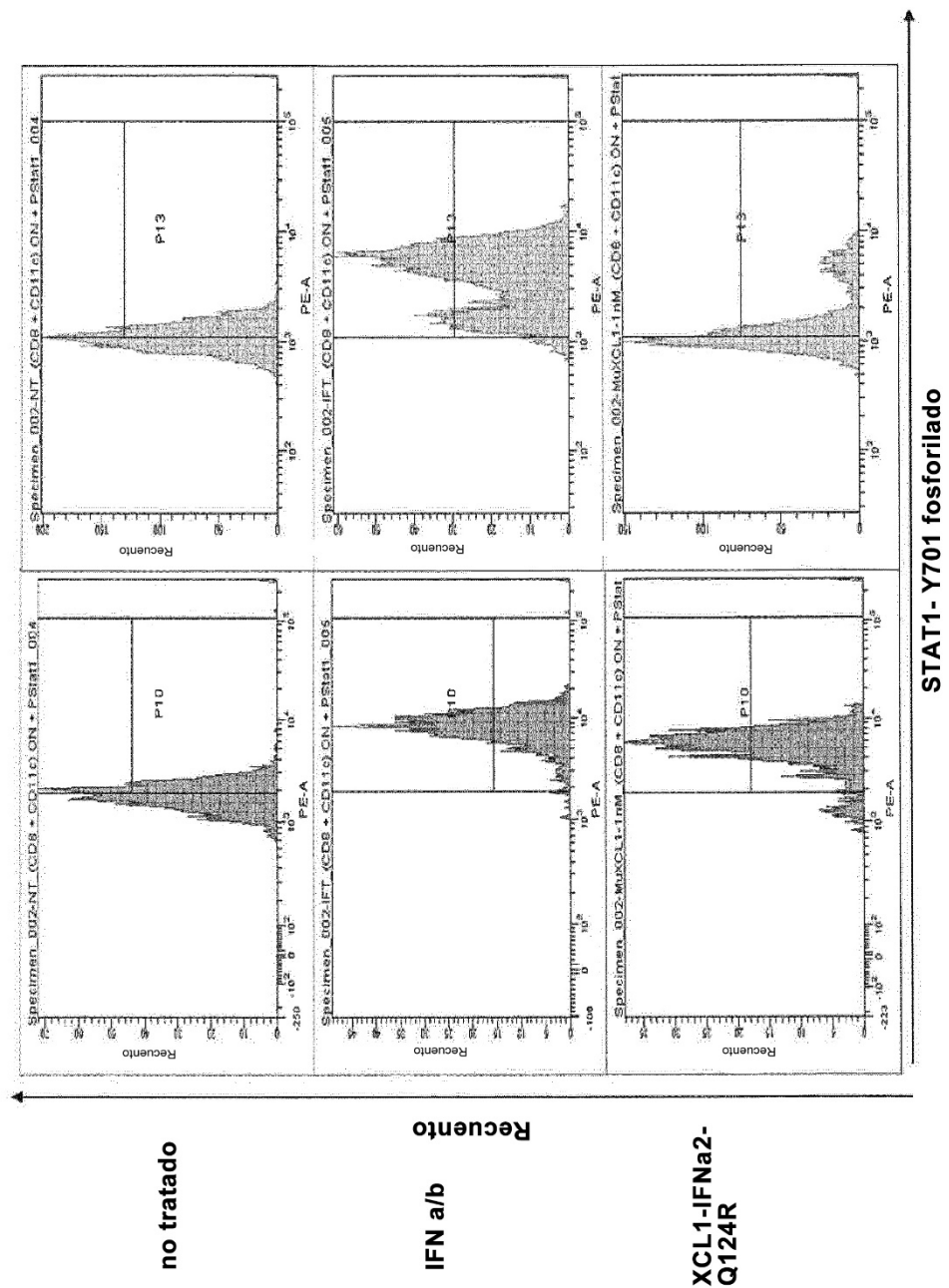


Figura 3

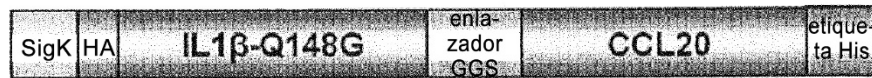
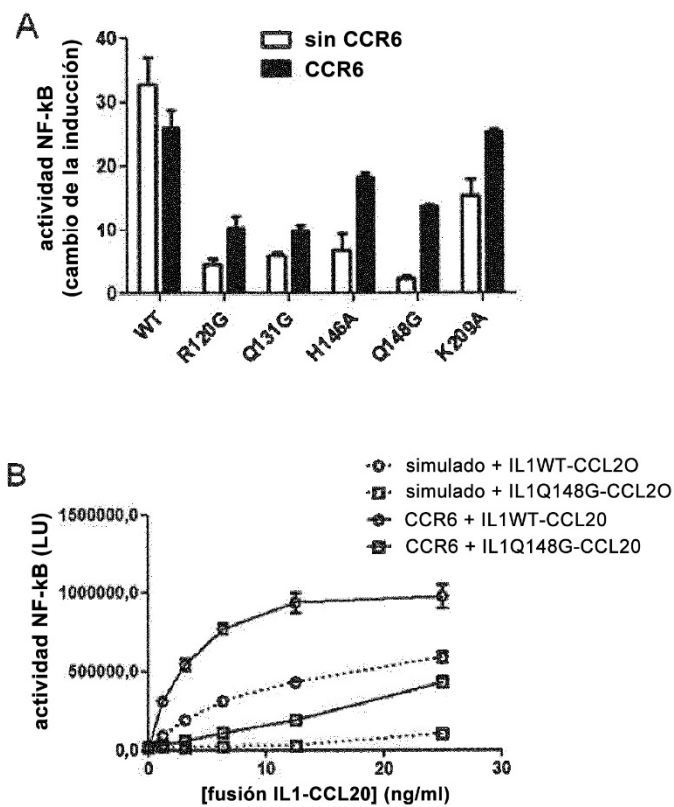


Figura 4



Continuación de la figura 4

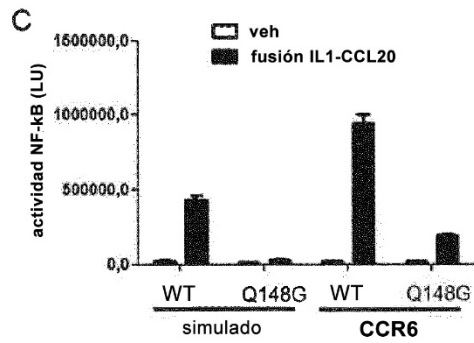
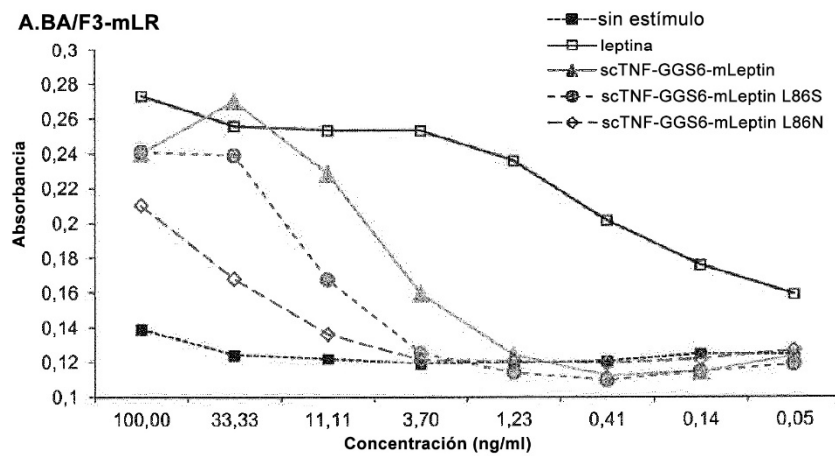


Figura 5



Figura 6



Continuación de la figura 6

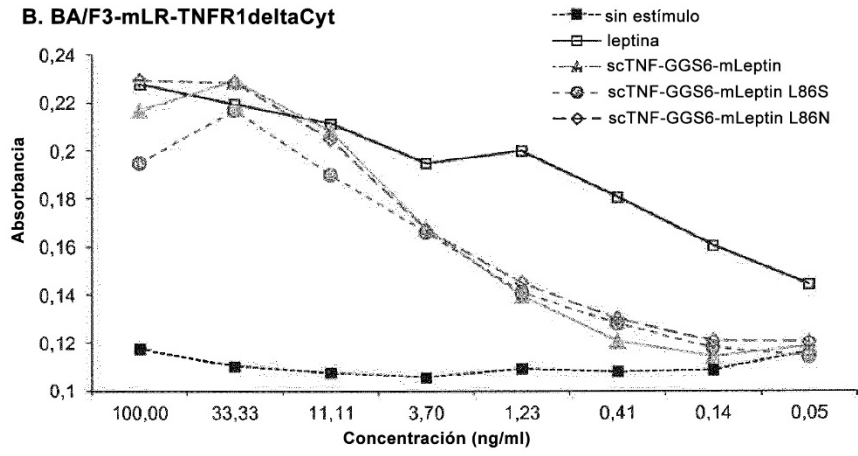
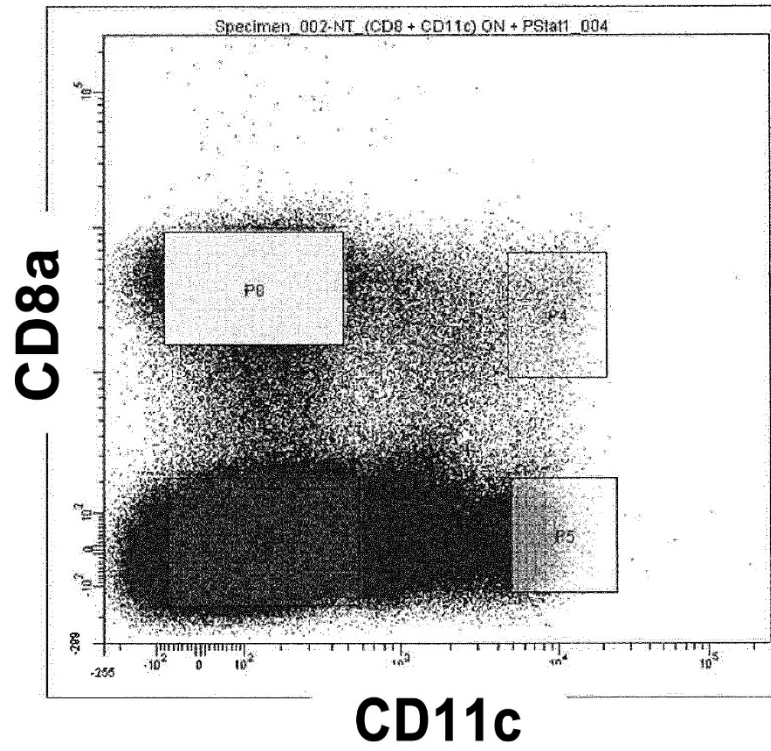
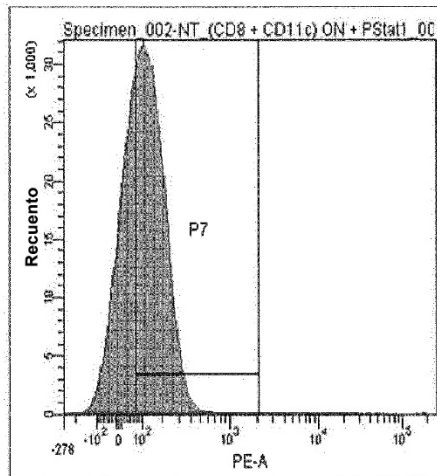


Figura 7

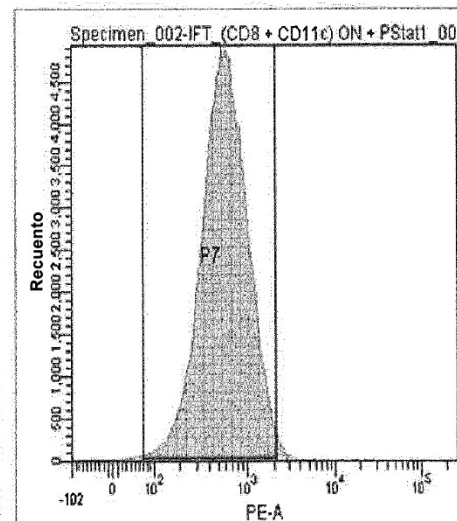
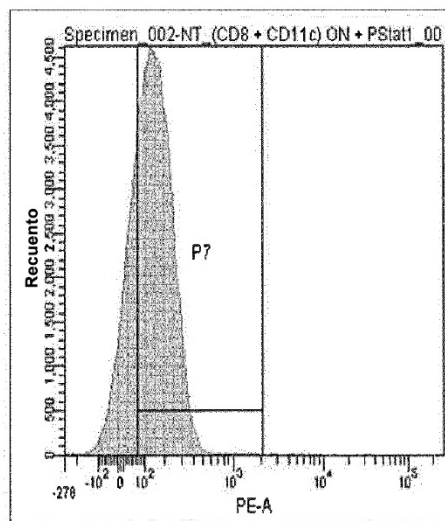
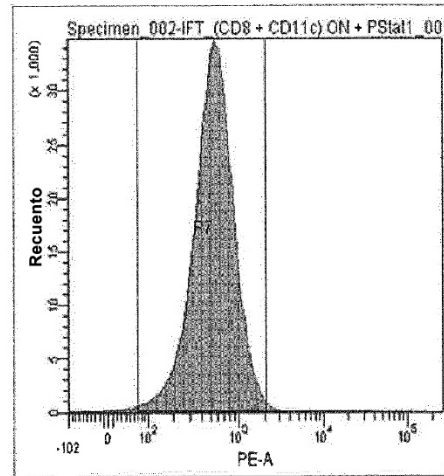


Continuación de la figura 7

PBS



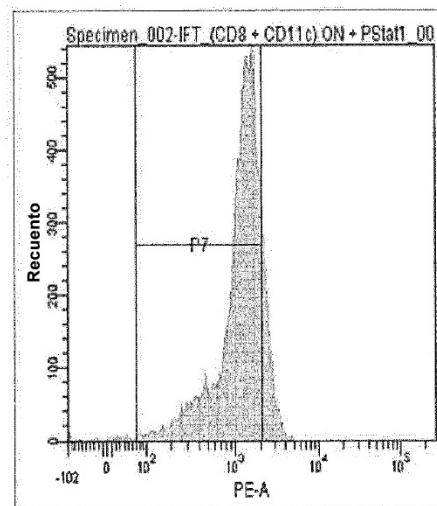
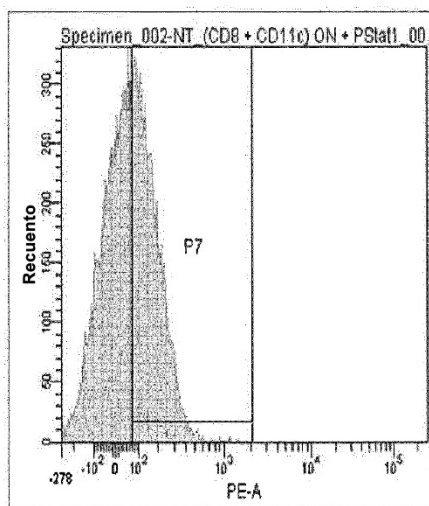
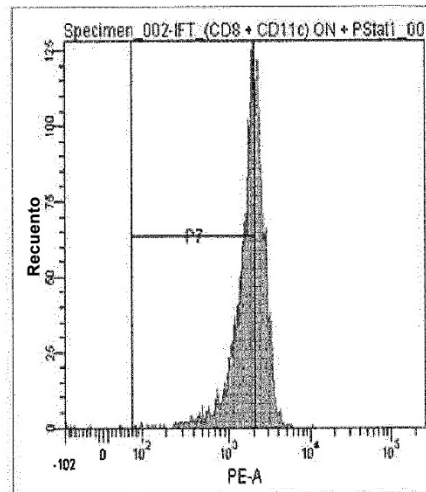
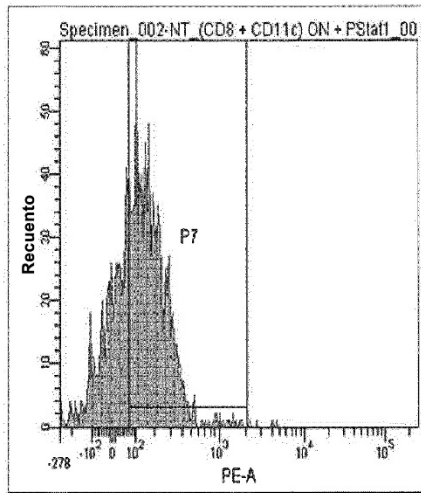
IFNαβ 10⁶ UI



Continuación de la figura 7

PB5

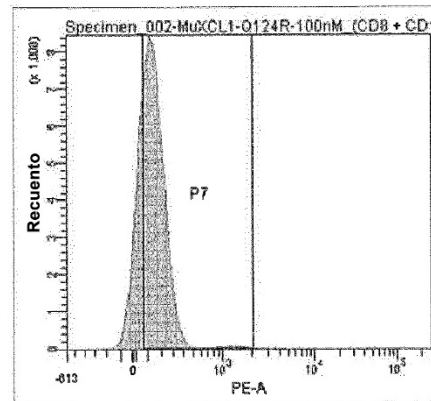
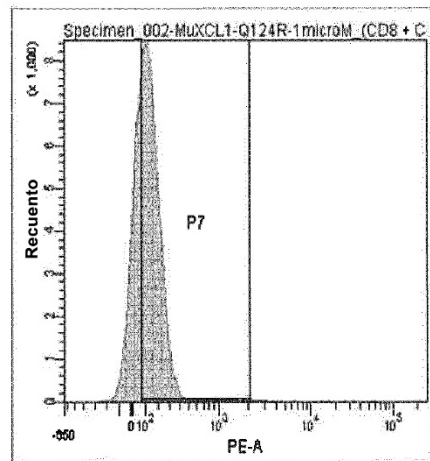
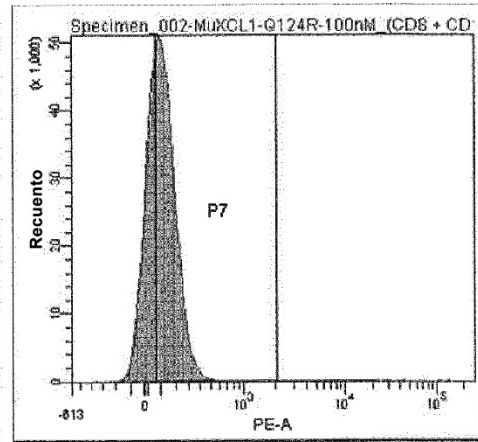
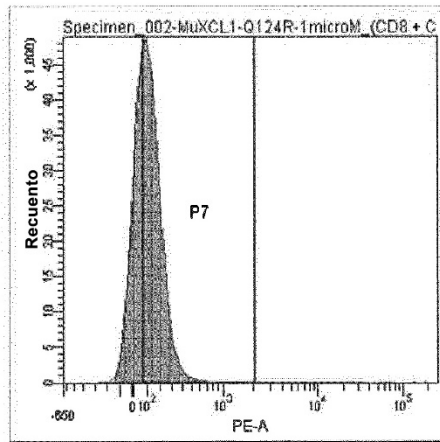
IFN α β 10^6 UI



Continuación de la figura 7

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10 μ g

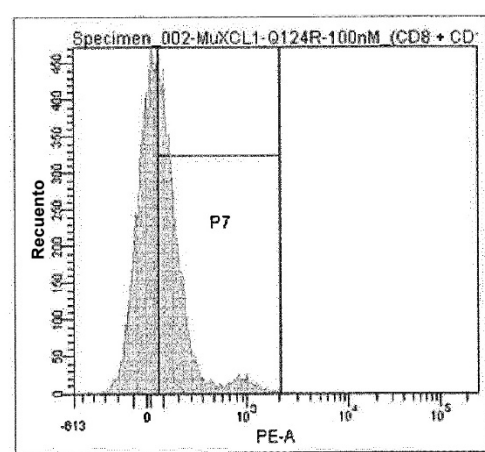
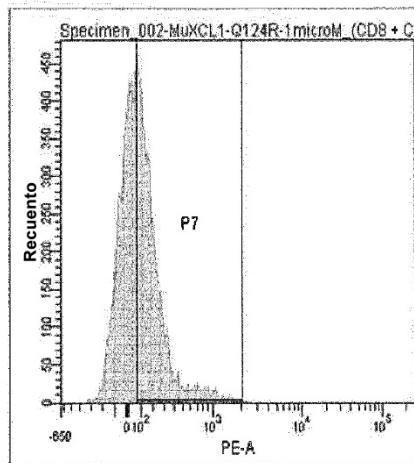
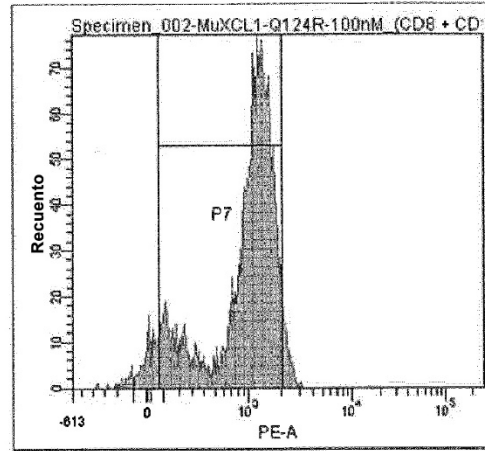
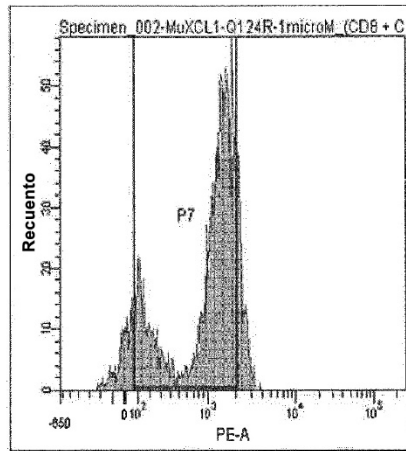
MuXCL1_IFNA2 Q124R 1 μ g



Continuación de la figura 7

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10 μ g

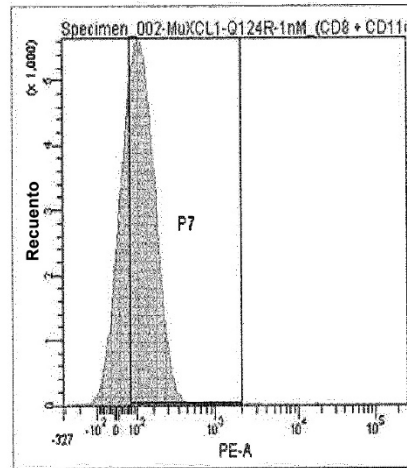
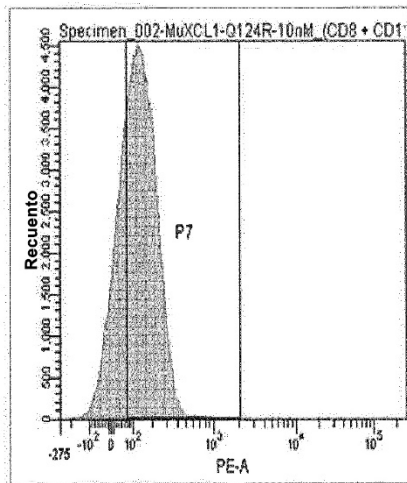
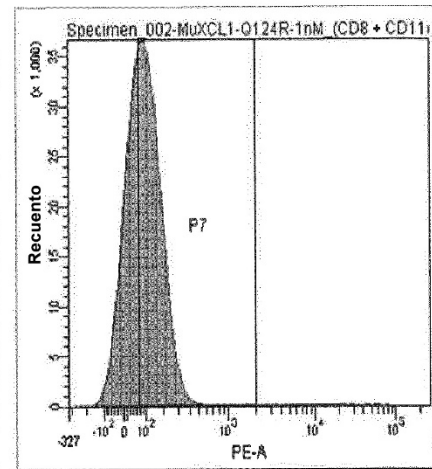
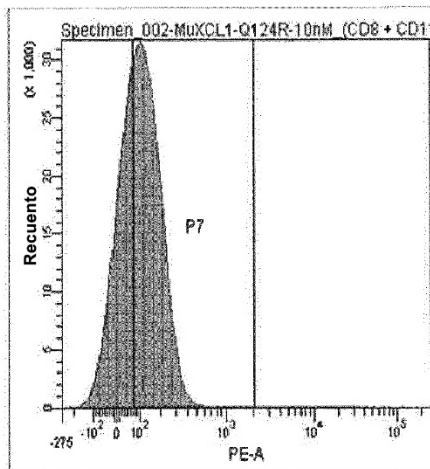
MuXCL1_IFNA2 Q124R 1 μ g



Continuación de la figura 7

MuXCL1_IFNA2 Q124R 100ng

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10ng



Continuación de la figura 7

MuXCL1_IFNA2 Q124R 100ng

MuXCL1_IFNA2 Q124R 10ng

