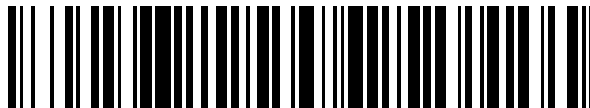


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 884**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 14/55	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2012 PCT/US2012/043914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12178137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2012 E 12803306 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2723380**

54 Título: **Proteínas de fusión de inmunoglobulina a través de cadena ligera y métodos de uso de ellas**

30 Prioridad:

24.06.2011 US 201161501161 P

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

06.05.2020

73 Titular/es:

**GILLIES, STEPHEN D. (100.0%)
47 Swanson Lane
Carlisle, MA 01741-1044, US**

72 Inventor/es:

GILLIES, STEPHEN D.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 758 884 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

Proteínas de fusión de inmunoglobulina a través de cadena ligera y métodos de uso de ellas

Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. de serie 61/501 161, presentada el 24 de junio de 2011, titulada "Light chain immunoglobulin fusion proteins and methods of use thereof".

Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos terapéuticos, y a métodos para su preparación y uso.

10 Antecedentes de la invención

15 La inmunocitocinas (proteínas de fusión de anticuerpo-citocina) se describieron por primera vez en la literatura a inicios de los años 90 y consistían en fusiones de anticuerpos enteros con citocinas tales como linfotóxina (TNF-β) o interleucina 2 (IL2). Estudios posteriores en modelos de tumor que expresaban GD2 en ratones indicaron que el anticuerpo ch14.18 y la inmunocitocina ch14.18-IL2 tenían ambas actividad antitumoral, pero que la inmunocitocina era mucho más potente que el anticuerpo, incluso cuando se combinaba con IL2 libre. Sabzevari H et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:9626-30; Pancook JD et al. (1996) Cancer Immunol Immunother 42:88-92; Becker JC et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:2702-7. Además, los ratones inmunocompetentes tratados con la inmunocitocina, pero no con el anticuerpo más la IL2, desarrollaron una respuesta inmunitaria adaptativa dependiente de linfocitos T CD8+ que prevenía la exposición tumoral posterior. Becker JC et al. (1996) J Exp Med 183:2361-6; Becker JC et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:7826-31. Por lo tanto, el direccionamiento de la IL2 hacia el microentorno tumoral induce un efecto de vacuna antitumoral que no se logra con el anticuerpo, ni solo ni junto con la citocina libre. Una inmunocitocina humanizada relacionada, hu14.18-IL2, recientemente ha logrado validación clínica preliminar en neuroblastoma recidivante como monoterapia, donde indujo una cantidad significativa de respuestas completas en pacientes que no contaban con otras opciones de tratamiento. Hu14.18-IL2 se ha descrito en la patente europea EP1 572 748. Muchas publicaciones describen la capacidad de esta molécula para activar varios componentes del sistema inmunitario para destruir células tumorales y provocar una respuesta de memoria de linfocitos T CD8 de larga duración que resiste la exposición tumoral posterior. La solicitud de patente EP0 998 305 describió una cadena pesada y ligera de Fab en donde la IL2 humana se fusiona a través de un enlazador al extremo C de la cadena ligera del Fab.

30 Compendio de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La proteína de fusión de la invención es una proteína de fusión de un anticuerpo o una proteína de fusión de un fragmento de unión a antígeno de este, que comprende una proteína de fusión de una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, en donde la proteína de fusión de cadena ligera comprende:

35 una región variable de longitud completa fusionada al extremo N de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y un péptido de fusión fusionado al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina sin un péptido enlazador,

en donde el péptido de fusión consiste en una citocina,

40 en donde la primera cadena pesada comprende una región variable de longitud completa fusionada al extremo N de la región constante de cadena pesada, y

en donde la citocina de dicho péptido de fusión

(i) es IL2, o

(ii) es IL2 humana, o

45 (iii) es IL2 humana, en donde la longitud de la región en el extremo N de la fusión de citocina se acorta 1 a 10 aminoácidos, o

(iv) es una IL2 que tiene una mutación en una o más posiciones correspondientes en la IL2 humana a D20, F42, R38, N88 o Q126.

50 En algunas realizaciones, aspectos se refieren a nuevas proteínas de fusión de anticuerpo que incluyen una fusión de cadena ligera, en donde el extremo aminico de la proteína de fusión se fusiona al extremo carboxílico de la cadena ligera (p. ej., el extremo carboxílico de la región constante de cadena ligera). De manera sorprendente, las

fusiones al extremo C de la región constante de cadena ligera no alteran las funciones efectoras naturales del anticuerpo intacto, a pesar del hecho de que el sitio de la fusión es adyacente a sitios de interacción en la cadena pesada necesarios para estas actividades. Por ejemplo, se conservan las funciones efectoras de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y GDC (citotoxicidad dependiente de complemento) en anticuerpos que contienen fusiones en la cadena ligera, incluso cuando un péptido de fusión se fusiona directamente a la Cys del extremo C de una región constante de cadena ligera (p. ej., de un anticuerpo IgG1).

En algunas realizaciones, aspectos se refieren a nuevas proteínas de fusión de anticuerpo que incluyen una fusión de cadena ligera, en donde el extremo carboxílico de la cadena ligera se fusiona al extremo amínico de la segunda proteína, y en donde el anticuerpo se une a una molécula de superficie celular (p. ej., un antígeno de superficie celular asociado al cáncer). En algunas realizaciones, las proteínas de fusión se estabilizan mediante la presencia de una unión disulfuro entre la Cys del extremo carboxílico de la región constante de cadena ligera y la Cys correspondiente de la región constante de cadena pesada. En algunas realizaciones, la unión de la porción de anticuerpo a una superficie celular provoca un cambio conformacional en la proteína de fusión que reduce la interferencia estérica con la segunda proteína y destapa, de este modo, su actividad. Por consiguiente, una proteína de fusión descrita en la presente memoria se puede usar para aumentar la especificidad celular de una proteína al reducir su actividad en la ausencia de unión a una célula diana de interés (p. ej., una célula cancerosa). Esta propiedad puede ser útil para enmascarar o reducir selectivamente las propiedades tóxicas de un compañero de fusión y proteger, de este modo, a las células que no son diana de la actividad de un compañero de fusión tóxico y exponer solamente a las células diana (p. ej., células cancerosas) a los efectos tóxicos.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión descrita en la presente memoria se puede diseñar para activar selectivamente una o un subconjunto de varias (p. ej., dos) formas de receptor diferentes. Por ejemplo, todos los miembros de la familia IL2 (p. ej., IL2, IL21 o IL15) se pueden unir a componentes del receptor intermedio de IL2 que comparten. En algunas realizaciones, se puede diseñar una fusión de un miembro de la familia IL2 al extremo C de una cadena ligera de un anticuerpo para bloquear estéricamente uno o más residuos que activan el receptor intermedio de IL2 (p. ej., D20 en IL2 o un aminoácido correspondiente en otra citocina, por ejemplo, IL21 o IL15). En algunas realizaciones, la longitud de la región del extremo N de la citocina se puede alterar (p. ej., acortar o alargar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos o más) para optimizar el grado de inactivación selectiva al modificar la extensión del impedimento estérico del (de los) aminoácido(s) activador(es) que se acerca(n) a la intersección de fusión debido a la eliminación de aminoácidos. Se debe apreciar que un experto puede producir sin inconvenientes varias formas de eliminación diferentes y evaluar sus actividades relativas contra diferentes receptores (p. ej., según se describe en la presente memoria). Se debe apreciar que un nivel de actividad óptimo puede depender del uso previsto de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la actividad contra una primera forma de receptor se puede reducir con respecto a la actividad contra una segunda forma de receptor. En algunas realizaciones, la actividad contra la segunda forma de receptor también se puede reducir.

En algunas realizaciones, para citocinas que activan solo una forma de receptor, se puede diseñar una proteína de fusión según se describe en la presente memoria para que tengan un nivel reducido de activación del receptor. En algunas realizaciones, se pueden hacer cambios a la cantidad de aminoácidos entre el extremo C de la cadena ligera y un aminoácido en la citocina que interactúa con y activa el receptor de citocina. Por ejemplo, la longitud de la región del extremo N de la porción de fusión de la citocina se puede alterar (p. ej., acortar o alargar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos o más). Se debe apreciar que un experto puede producir sin inconvenientes varias formas de eliminación diferentes y evaluar sus actividades relativas en un ensayo con receptor in vivo o in vitro adecuado. Se debe apreciar que un nivel de actividad óptimo puede depender del uso previsto de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, se puede reducir la actividad de la citocina contra un receptor diana. Sin embargo, el nivel más bajo de actividad puede no ser óptimo dependiendo del uso previsto. En algunas realizaciones, el nivel de actividad de la citocina no se reduce mediante la fusión (o incluso se puede aumentar).

De manera similar, la actividad de otras proteínas (p. ej., otras enzimas) fusionadas a una cadena ligera del anticuerpo (p. ej., a un anticuerpo que se une a un receptor de superficie celular) se puede alterar (p. ej., optimizar para un uso específico). En algunas realizaciones, se pueden hacer cambios a la cantidad de aminoácidos entre el extremo C de la cadena ligera y un aminoácido en la proteína que es importante para la actividad. Por ejemplo, la longitud de la región del extremo N de la porción de fusión de la citocina se puede alterar (p. ej., acortar o alargar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos o más). Se debe apreciar que un experto puede producir sin inconvenientes varias formas de eliminación diferentes y evaluar sus actividades relativas en un ensayo in vivo o in vitro adecuado. Se debe apreciar también que un nivel de actividad óptimo puede depender del uso previsto de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la actividad de la proteína (p. ej., enzima) se puede reducir. Sin embargo, el nivel más bajo de actividad puede no ser óptimo dependiendo del uso previsto. En algunas realizaciones, el nivel de actividad no se reduce mediante la fusión (o incluso se puede aumentar).

En algunas realizaciones, aspectos se refieren a una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende una primera proteína de fusión de cadena ligera, en donde la primera proteína de fusión de cadena ligera incluye una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y un péptido de fusión fusionado al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es un péptido que no es inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es una inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno de superficie celular. En algunas realizaciones, una región de extremo N de una

citocina se usa como un enlazador para conectar el extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina con el extremo N del péptido de fusión. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina también incluye una primera proteína de cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., una primera cadena pesada de anticuerpo o una porción de esta).

- 5 En algunas realizaciones, el péptido de fusión tiene entre 5 y 500 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido de fusión comprende un haz helicoidal alfa. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es una proteína de unión a receptor. Se debe apreciar que el péptido que no es inmunoglobulina puede ser una citocina según se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la citocina es IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, GM-CSF o α -interferón. Sin embargo, otras citocinas se pueden fusionar al extremo C de la cadena ligera dado que la descripción
10 no está limitada en este sentido. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es una enzima proteica o ribonucleasa. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es un Fv de cadena simple y un péptido de citocina de extremo N se usa como un enlazador para conectar el extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina con el extremo N del Fv de cadena simple. En algunas realizaciones de la invención, el péptido de citocina de extremo N es un péptido de extremo N de IL2. En algunas realizaciones, el péptido de citocina de
15 extremo N tiene 1-10 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina también incluye una región variable (p. ej., una región variable de longitud completa o una porción de unión a antígeno de esta) fusionada al extremo N de la región constante de cadena ligera y/o una región variable (p. ej., una región variable de longitud completa o una porción de unión a antígeno de esta) en el extremo N de una región constante de cadena pesada.

- 20 En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera es una región constante C_{κ} o C_{λ} . En algunas realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada de IgG. En algunas realizaciones, la cadena pesada de IgG es una cadena pesada de IgG1, una cadena pesada de IgG3, una cadena pesada de IgG2 o IgG4. En algunas realizaciones, la cadena pesada de IgG2 o IgG4 se modifica para incluir una secuencia de IgG1 o IgG3 que confiere función efectora de ADCC y/o CDC. En algunas realizaciones, la secuencia de IgG1 que confiere función efectora de
25 ADCC y/o CDC es una bisagra de IgG1.

- En algunas realizaciones de la invención, el péptido de fusión se fusiona al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina sin un péptido enlazador. En algunas realizaciones, el péptido de fusión se fusiona a la Cys del extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el péptido de fusión se fusiona al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina a través de un
30 péptido enlazador. Se debe apreciar que el péptido enlazador puede tener cualquier longitud adecuada, por ejemplo, 1-20 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 5 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido enlazador es un péptido poli-Gly, un péptido de combinación (Gly4-Ser) $_x$, o 3-10 aminoácidos del extremo N de una citocina similar a IL2, o los primeros 7 aminoácidos del extremo N de IL2.

- 35 En algunas realizaciones, cada uno de los péptidos de inmunoglobulina y péptidos de fusión son independientemente secuencias de humano, ratón, perro, bovino o gato. En algunas realizaciones, una o más regiones variables de las primeras cadenas pesada y ligera son secuencias murinas. Se debe apreciar que las secuencias pueden ser humanizadas, quiméricas, variantes (p. ej., una o más mutaciones pueden estar presentes en cualquiera de las regiones de inmunoglobulina), o cualquier combinación de estas.

- 40 En algunas realizaciones, el péptido de fusión comprende una secuencia de citocina humana. En algunas realizaciones, la citocina tiene una mutación en un residuo que es un punto de contacto con un receptor, un sitio activo o una combinación de estos. En algunas realizaciones, la mutación que reduce la actividad de citocina. Por ejemplo, un péptido de fusión de la invención puede ser una IL2 que tiene una mutación en una o más posiciones correspondientes en la IL2 humana a D20, R38, N88 o Q126.

- 45 En algunas realizaciones, las primeras cadenas pesada y ligera se unen específicamente a un antígeno de superficie celular (p. ej., un antígeno asociado al cáncer). Por consiguiente, en algunas realizaciones, las primeras cadenas pesada y ligera se unen específicamente a un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un ácido nucleico, p. ej., una molécula de ADN. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral no es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral proteínico, por ejemplo, un polipéptido. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un polisacárido. En algunas realizaciones, el antígeno
50 tumoral es GD2, CD20, CD19, CSPG o EpCAM. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina se une específicamente a una proteína vírica. En algunas realizaciones, el antígeno de superficie celular y/o el antígeno tumoral es una proteína vírica. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina (p. ej., las primeras proteínas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera se unen a un antígeno diana con una afinidad o K_d de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-12} M. Sin embargo, pueden tener afinidades más altas o más bajas dado que los
55 aspectos descritos en la presente memoria no están limitados en este sentido.

En algunas realizaciones, aspectos descritos en la presente memoria se refieren a inmunocitocinas nuevas. Las inmunocitocinas son anticuerpos genéticamente manipulados enlazados a citocinas potentes (p. ej., IL2) para dirigir las citocinas hacia un sitio de enfermedad donde serán eficaces.

Aspectos descritos en la presente memoria se refieren a nuevas citocinas en donde el extremo amínico de la citocina se fusiona al extremo carboxílico de la cadena ligera del anticuerpo (p. ej., el extremo carboxílico de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a una proteína de superficie celular). Se halló que las fusiones de la cadena ligera conservaban las dos funciones efectoras de ADCC y CDC a pesar de la presencia de la citocina acoplada al extremo C de la región constante de cadena ligera. Además, se halló que la farmacocinética de las fusiones de cadena ligera era mejor (p. ej., semivida más extensa) que la de las fusiones de cadena pesada. Estas observaciones respaldan los nuevos usos para las inmunocitocinas de fusión de cadena ligera. En algunas realizaciones, las inmunocitocinas de fusión de cadena ligera se pueden suministrar linfáticamente (p. ej., subcutáneamente) y exhibir suficiente biodisponibilidad para ser eficaces clínicamente. En algunas realizaciones, las inmunocitocinas de cadena ligera son útiles para tratar ciertos cánceres linfáticos (p. ej., linfomas y leucemia), así como cánceres asociados a metástasis linfática (p. ej., ciertos cánceres de mama y otros cánceres donde son comunes las metástasis a los vasos linfáticos).

De manera similar, en algunas realizaciones, se pueden administrar fusiones de otras proteínas (p. ej., enzimas terapéuticas) al extremo C de una cadena ligera de anticuerpo (p. ej., la cadena ligera de un anticuerpo que se une a una proteína de superficie celular) subcutáneamente para tratar una enfermedad (p. ej., cáncer).

En algunas realizaciones, se puede reducir la frecuencia de dosificación al administrar inmunocitocinas de fusión de cadena ligera en lugar de inmunocitocinas de fusión de cadena pesada. En algunas realizaciones, la administración subcutánea de inmunocitocinas de fusión de cadena ligera proporciona una reserva o depósito de moléculas biodisponibles que pueden ingresar al torrente circulatorio y proporcionar beneficios terapéuticos durante un período de tiempo más largo que el posible con las fusiones de inmunocitocina de cadena pesada tradicionales.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, una proteína de fusión de anticuerpo de cadena ligera (p. ej., inmunocitocina) se puede administrar subcutáneamente a una dosificación menor que aproximadamente 50 mg por metro cuadrado a un sujeto. En algunas realizaciones, una proteína de fusión de anticuerpo de cadena ligera (p. ej., inmunocitocina) se puede administrar intravenosamente a una dosificación menor que aproximadamente 10 mg por metro cuadrado (p. ej., aproximadamente 5-10 mg por metro cuadrado, aproximadamente 1-5 mg por metro cuadrado, o menos). Sin embargo, se debe apreciar que también se puede usar dosis más altas en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina o composición se administra a una frecuencia de una vez por semana o a una frecuencia más baja (p. ej., una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, mensualmente). Sin embargo, se debe apreciar que una proteína de fusión o composición descrita en la presente memoria se puede administrar con cualquier frecuencia, incluso diariamente, o una vez cada 2, 3, 4, 5 o 6 días, en algunas realizaciones.

Las inmunocitocinas que incluyen una fusión de la citocina a la cadena pesada del anticuerpo se han evaluado anteriormente y exhibido una estimulación de respuestas inmunitarias fuertes contra tumores en ratones, en algunos casos, con la erradicación del tumor y protección a largo plazo contra la recidiva. Los ejemplos de fusiones de cadena pesada incluyen fusiones con secuencias de anticuerpo anti-unión a GD2 (GD2 es un antígeno asociado a neuroblastomas y melanomas), secuencias de anticuerpo anti-unión a EpCAM (EpCAM se asocia a cánceres de próstata, pulmón, colon, mama y gástricos). Sin embargo, las proteínas de fusión de cadena pesada tienen modificaciones necesarias para aumentar su semivida y eficacia terapéutica. En cambio, las proteínas de fusión de cadena ligera tienen semividas significativamente más extensas y mayor biodisponibilidad en comparación con las inmunocitocinas de cadena pesada, mientras conservan las dos funciones efectoras de ADCC y CDC y actividad de citocina.

En algunas realizaciones, aspectos se refieren a una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende una proteína de fusión de una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la proteína de fusión de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y un péptido de fusión, en donde el péptido de fusión se fusiona al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es un Fv de cadena simple. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es un péptido que no es inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el péptido de fusión tiene entre 5 y 500 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido de fusión comprende un haz helicoidal alfa. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es una proteína de unión a receptor. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es una citocina. En algunas realizaciones, la citocina es IL-7, IL-15, IL-21, GM-CSF o α -interferón. Según la invención, la citocina es IL2.

En algunas realizaciones, el péptido de fusión puede ser cualquier péptido adecuado fusionado al extremo C de la cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es citotóxico o citostático. En algunas realizaciones, el péptido de fusión proporcionar una señal detectable. En algunas realizaciones, el péptido de fusión es una enzima proteica o toxina tal como una ribonucleasa.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende, además, una región variable fusionada al extremo N de la región constante de cadena ligera. En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera es una región constante C_{κ} o C_{λ} . En algunas realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada de IgG. En algunas realizaciones, la cadena pesada de IgG es una cadena pesada de IgG1 o IgG3. En algunas realizaciones, la cadena pesada de IgG es una cadena pesada de IgG2 o IgG4. En algunas realizaciones, la cadena

pesada de IgG2 o IgG4 se modifica para incluir una secuencia de IgG1 o IgG3 (p. ej., una bisagra de IgG1) que confiere función efectora de ADCC y/o CDC, o mejores propiedades físicas.

En algunas realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada de IgA, IgD, IgE o IgM.

5 En algunas realizaciones de la invención, el péptido de fusión se fusiona al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina sin un péptido enlazador. En algunas realizaciones, el péptido de fusión se fusiona a la Cys del extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina.

10 En algunas realizaciones de la descripción, la inmunoglobulina contiene un péptido de fusión que se fusiona al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina a través de un péptido enlazador. En algunas realizaciones, el péptido enlazador tiene 1-20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido enlazador tiene aproximadamente 5 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el péptido enlazador es un péptido poli-Gly o un péptido de combinación (Gly4-Ser)_x. En algunas realizaciones, el péptido enlazador tiene una secuencia que corresponde a un péptido del extremo amínico de una citocina.

15 En algunas realizaciones, uno o más residuos aminoácidos (p. ej., 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5 u otra cantidad) se retiran o se agregan del/al extremo amínico del compañero de fusión. Según aspectos descritos en la presente memoria, la longitud y la conformación de la conexión entre la cadena ligera y el compañero de fusión influye sobre la actividad o selectividad de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, un compañero de fusión puede ser altamente activo si la distancia entre el extremo C de la cadena ligera y el aminoácido activo del compañero de fusión (p. ej., un aminoácido que es importante para el contacto con el receptor) es aproximadamente 20 aminoácidos (p. ej., ~ 23-24 residuos). En algunas realizaciones, la actividad del compañero de fusión se puede reducir al retirar uno o más (p. ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos de la región del extremo N del compañero de fusión. Se debe apreciar que la cantidad exacta de residuos que se deben eliminar para la inactivación puede depender del compañero de fusión. Sin embargo, un experto en la técnica puede someter a prueba diferentes longitudes de eliminación para identificar las que dan lugar al nivel deseado de inactivación.

25 En algunas realizaciones, una o más actividades que se reducen mediante la fusión al extremo C de una cadena ligera de anticuerpo se pueden recuperar después de la unión a un anticuerpo diana (p. ej., en una superficie celular) debido a un cambio de conformación del anticuerpo después de la unión que da lugar a una reducción del impedimento estérico que inactivó el compañero de fusión.

30 En algunas realizaciones, se puede usar un ensayo de unión a perla para evaluar el nivel de actividad de un compañero de fusión de proteína (p. ej., una citocina) después de la unión del anticuerpo compañero a una diana (p. ej., una superficie celular) con respecto a la actividad del compañero de fusión en disolución (p. ej., en ausencia de unión a anticuerpo). Se debe apreciar que un ensayo de unión a perla se puede desarrollar al recubrir una perla con un antígeno diana (p. ej., una proteína de superficie celular, por ejemplo, una proteína de superficie celular asociada al cáncer) al que se une selectivamente la porción de anticuerpo de una proteína de fusión descrita en la presente memoria. Se puede usar cualquier tamaño de perla adecuado. En algunas realizaciones, el diámetro de la perla es aproximadamente el tamaño de una célula diana. Sin embargo, una perla puede ser más pequeña o más grande. Se debe apreciar que se pueden usar otros sustratos sólidos (p. ej., superficies planas, placas, geles, canal, material de cromatografía, etc., o cualquier combinación de estos) (p. ej., recubiertos con un antígeno diana) en lugar de una perla para llevar a cabo un ensayo para comparar la actividad de una proteína de fusión en disolución con respecto a una proteína de fusión unida a un sustrato. Esta actividad relativa se puede usar para evaluar la probabilidad que de una proteína de fusión esté activa cuando se una a una célula diana (por ejemplo, incluso si la proteína de fusión es inactiva o tiene niveles bajos de actividad en disolución). En algunas realizaciones, un aumento relativo en la actividad después de la unión a una perla recubierta con antígeno u otro sustrato según se describe en la presente memoria es un indicio de que la proteína de fusión tendrá mayor actividad in vivo (p. ej., cuando se administra a un sujeto) cuando se una a un antígeno diana (p. ej., un antígeno de superficie celular). En algunas realizaciones, un aumento relativo en la actividad se puede usar para determinar si una proteína de fusión exhibirá un aumento selectivo en la actividad cuando se administra a un sujeto (p. ej., para una primera forma de receptor con respecto a una segunda forma de receptor para proteínas de fusión que son capaces de unirse a y/o activar dos o más formas de receptor diferentes, por ejemplo, receptores de afinidad alta - intermedia - y/o baja).

50 En algunas realizaciones, varios de los aminoácidos del extremo N (p. ej., los primeros 3-20, p. ej., los primeros 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 10-20) de IL2 se insertan entre la Cys del extremo C de la cadena L y el primer residuo de un compañero de proteína de fusión (p. ej., citocina, enzima, scFv u otra proteína) para ayudar a estabilizar la proteína de fusión (p. ej., al promover la formación de uniones disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada fusionadas del anticuerpo). Se debe apreciar que la cantidad de aminoácidos de IL2 que son útiles para estabilizar la proteína de fusión puede depender de los compañeros de fusión, pero el experto en la técnica puede someter a prueba sin inconvenientes diferentes cantidades y determinar una cantidad adecuada para un uso de interés. En algunas realizaciones, la inserción de aminoácidos del extremo N de IL2 se puede usar para producir una proteína de fusión que se activa (o cuya actividad se aumenta) después de unirse a un antígeno diana (p. ej., en una célula diana). Un experto en la técnica puede determinar la cantidad de residuos de IL2 que son útiles para formar una composición estable y/o una composición que se activa mediante la unión al antígeno (p. ej., mediante el uso de ensayos de activación celular o ensayos de unión a perla según describió en la presente memoria). En algunas realizaciones,

varios aminoácidos del extremo N (p. ej., los primeros 3-20, p. ej., los primeros 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 10-20) de una o más citocinas distintas (p. ej., otras citocinas relacionadas con IL2) se pueden evaluar y/o usar como un enlazador para estabilizar una construcción de fusión y/o producir una construcción de fusión que se activa después de la unión al antígeno.

- 5 En algunas realizaciones, una proteína de fusión de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en una de las siguientes secuencias. En cada una de estas secuencias la secuencia de cadena ligera se muestra en letras mayúsculas (con la región variable en cursiva) y el péptido de fusión se muestra en letras minúsculas. En estas realizaciones, la secuencia de cadena ligera contiene una región variable 14.18 de ratón y una región constante de cadena ligera humana fusionada a una secuencia de IL2 humana. Las variantes de secuencia de aminoácidos están subrayadas de la secuencia de IL2 están subrayadas en letras minúsculas. Un espaciador de 10 4 aminoácidos está subrayado en letras mayúsculas para las SEQ ID NOs: 3 y 4.

SEQ ID NO: 1

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstkkqlqlehlldlqmilnginnyknpltrmltfkfympkka
 telkhlqleeeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlis ninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 2

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstkkqlqlehlldlqmilnginnyknpltrmltfkfympkkate
 lkhlqleeeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlis ninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 3

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQRVDaptssstkkqlqlehlldlqmilnginnykn
 pltrmltfkfympkkatelkhlqleeeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwi
 15 tfcqsiistlt

SEQ ID NO: 4

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQRVDaptssstkkqlqlehlldlqmilnginnyknpltrml
 tfkfympkkatelkhlqleeeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsi
 20 stlt

- Se debe apreciar que cada uno de los péptidos de inmunoglobulina y péptidos de fusión pueden ser independientemente de cualquier origen de especie (p. ej., secuencias humanas, de ratón, de perro, de bovino, de gato o de otra especie). Se debe apreciar también que las secuencias se pueden modificar (p. ej., humanizar y/o desinmunizar, y/o modificar su actividad, etc.). En algunas realizaciones, una o más regiones variables son secuencias murinas. En algunas realizaciones, una o más regiones variables comprenden secuencias humanizadas y/o desinmunizadas. En algunas realizaciones, el péptido de fusión incluye una secuencia de citocina humana. En algunas realizaciones, se usa una secuencia alterada (p. ej., mutada) de una o más regiones de inmunoglobulina, por ejemplo, para reducir o potenciar selectivamente una función efectora específica (p. ej., un reemplazo de E233-25 L234-L235-G236 a P-V-A en IgG1 humana para ADCC reducida; o una mutación K322A en la IgG1 humana para CDC reducida). Se debe apreciar que las alteraciones de secuencia pueden ser sustituciones, inserciones, eliminaciones, duplicaciones de aminoácidos simples o múltiples, o cualquier combinación de estas. Se debe apreciar también que estas u otras alteraciones de secuencia se pueden usar solas o en combinación.

- En algunas realizaciones, el péptido de fusión es un mutante de citocina (p. ej., que tiene una mutación en un residuo que es un punto de contacto con un receptor, en un residuo que reduce la toxicidad y/o en un residuo que altera la especificidad, etc., o cualquier combinación de estos), un fragmento de citocina (p. ej., que conserva suficientes propiedades funcionales) u otra variante de citocina, o cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, una fusión de anticuerpo a través de la cadena ligera puede incorporar una o más variantes o fragmentos de citocina (p. ej., IL2) descritos en las patentes estadounidenses núms. 7 371 371; 7 514 073; o 7 803 361 de Epstein et al. En algunas realizaciones, una fusión de anticuerpo a través de la cadena ligera puede incorporar una o más variantes o fragmentos de citocina (p. ej., IL2, IL-4, IL-9) descritos en las patentes estadounidenses núms. 6 028 176; 6 313 272; 6 335 426; 6 955 807; 7 105 653 o 7 423 123 de Shanafelt et al.
- En algunas realizaciones, la citocina tiene una mutación que reduce la actividad de citocina de a 5 a 100 veces.
- En algunas realizaciones, la citocina es una citocina humana, de ratón, de canino, de felino, de bovino o de otra especie, o una variante de estas. En algunas realizaciones de la invención, la citocina es una IL2 que tiene una mutación en una o más posiciones correspondientes en la IL2 humana a D20, R38, F42, N88 o Q126. En algunas realizaciones de la descripción, la citocina es una IL-15 que tiene una mutación en N72 (p. ej., N72D). En algunas realizaciones de la descripción, una inmunoglobulina se fusiona a un agente, por ejemplo, un agente para generación de imágenes, un agente radioetiquetado, un agente citotóxico o citostático, etc., o cualquier combinación de estos a través de una fusión en el extremo C de la cadena ligera.
- En algunas realizaciones, la inmunocitocina se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es una molécula de ADN. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un antígeno de tumor proteínico. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un polisacárido, un lípido o un lipopolisacárido. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un polipéptido. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor se selecciona de GD2, CD20, CD19, CSPG4 y EpCAM. En algunas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un antígeno de matriz extracelular tal como fibronectina oncofetal.
- En algunas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un antígeno específico para la vasculatura. En algunas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un antígeno específico para macrófagos.
- En algunas realizaciones, la citocina se selecciona del grupo que consiste en: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-35, G-CSF, GM-CSF, TGF- β e IFN- α/β . En algunas realizaciones, la citocina (p. ej., humana, no humana, de mamífero y/o recombinante) es una citocina que induce la producción y/o la activación de linfocitos citolíticos naturales. En algunas realizaciones, la citocina (p. ej., humana, no humana, de mamífero y/o recombinante) es una citocina que induce la producción y/o la activación de linfocitos T citotóxicos.
- Según algunos aspectos, se proporcionan métodos para producir una inmunoglobulina que tiene una proteína de fusión a través de cadena ligera. En algunas realizaciones, el extremo N del péptido de fusión se fusiona directamente al extremo C de la cadena ligera de inmunoglobulina.
- En algunas realizaciones, se proporciona una versión mutada de la región constante de cadena pesada gamma de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, se proporciona una versión mutada de una citocina. En algunas realizaciones, la función de la citocina se modifica para mantener un equilibrio entre las actividades de la citocina y las actividades de función efectora de la inmunocitocina. En algunas realizaciones, se puede usar una o más secuencias mutantes para reducir la actividad de la citocina y/o aumentar la actividad de una o más funciones efectoras de inmunoglobulina (p. ej., reducir la relación entre la actividad de citocina y la actividad de función efectora en 1-100 (p. ej., 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100) con respecto a la relación de actividades cuando se usan secuencias no mutantes en la proteína de fusión).
- Según otros aspectos, se proporcionan métodos de direccionamiento hacia una citocina en un sujeto (p. ej., un humano o mamífero). En algunas realizaciones, los métodos de direccionamiento comprenden administrar una cualquiera de las inmunocitocinas descritas en la presente memoria al sujeto.
- Según otros aspectos, se proporcionan métodos para promover la ADCC en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos para promover la ADCC comprenden administrar una cualquiera de las inmunocitocinas descritas en la presente memoria al sujeto.
- Según algunos aspectos, se proporcionan métodos para proporcionar inmunocitocinas con inmunogenicidad reducida en función de diferencias en comparación con inmunocitocinas en las que la citocina se fusiona a la cadena pesada. Estas diferencias incluyen la falta inherente del extremo C de cadena ligera para contribuir a la energía de unión a moléculas de MHC clase II humanas de posibles péptidos de fusión que podrían procesarse in vivo y presentarse mediante estas moléculas a linfocitos T cooperadores, y la degradación reducida de inmunocitocinas fusionadas a la cadena ligera después de unirse a receptores Fc en células que presentan antígeno que podría conducir a su captación y presentación.
- En algunas realizaciones, anticuerpos recombinantes son inmunocitocinas e incluyen una o más proteínas citocina o porciones de estas. Las inmunocitocinas descritas en la presente memoria generalmente incluyen un anticuerpo, o

un fragmento o derivado de unión a antígeno de este, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana, enlazado a una citocina.

Las inmunocitocinas descritas en la presente memoria pueden incluir una o más secuencias peptídicas que son adecuadas para administración a un sujeto particular (p. ej., humano, no humano o animal no roedor, p. ej., perro, gato, etc.).

En algunas realizaciones, un anticuerpo o una inmunocitocina es una proteína recombinante que se puede expresar a partir de un gen recombinante (p. ej., que incluye secuencias codificantes para la unión a antígeno y/o polipéptidos de citocina fusionadas dentro del marco en la configuración adecuada y bajo control genético adecuado). Por consiguiente, las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a ácidos nucleicos recombinantes que codifican un anticuerpo o una inmunocitocina. Otras realizaciones incluyen células hospedantes.

Algunas realizaciones proporcionan ácidos nucleicos (p. ej., ácidos nucleicos aislados) que codifican la totalidad o una porción de anticuerpos, dominios de unión a antígeno, citocinas e/o inmunocitocinas descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes de ácido nucleico (p. ej., de una región de anticuerpo y/o una citocina) se optimizan para la clonación y/o expresión (p. ej., en células de mamífero). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se incluyen en vectores (p. ej., plásmidos) que tienen una o más secuencias de replicación y/o seleccionables (p. ej., orígenes de replicación, marcadores antibióticos, etc.). Algunas realizaciones proporcionan células hospedantes transformadas con uno o más ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la célula hospedante es una célula bacteriana, de levadura, de insecto o de mamífero. En algunas realizaciones, la célula hospedante es una célula CHO o una célula NS/O.

En algunas realizaciones, se proporciona una proteína de fusión de inmunoglobulina (p. ej., una inmunocitocina) que se puede unir y eluir a partir de proteína A Sepharose (p. ej., mediante el uso de condiciones ácidas) y permanecer biológicamente activa y en un estado no aglomerado. En algunas realizaciones, se puede aislar una proteína de fusión de inmunoglobulina (p. ej., una inmunocitocina) el poner en contacto un extracto de célula hospedante descrito en la presente memoria con una columna adecuada (p. ej., una columna de proteína A) y eluir la proteína unida (p. ej., después de una o más etapas de lavado).

En algunas realizaciones, una inmunocitocina es una proteína sintética que se produce mediante el uso de técnicas de química sintética.

Se debe apreciar que independientemente de cómo se produce una inmunocitocina, las diferentes porciones de la proteína (p. ej., la citocina, el anticuerpo o porción de unión a antígeno, y/o regiones de estos) se pueden fusionar a través de uno o más péptidos enlazadores. En el caso de proteínas de fusión recombinantes, los enlazadores se codifican mediante secuencias de ácido nucleico que se ubican, dentro del marco, entre las regiones codificantes de las diferentes porciones de inmunocitocina. En el caso de proteínas sintéticas, los péptidos enlazadores se introducen durante la síntesis. En algunas realizaciones, las inmunocitocinas sintéticas pueden incluir enlazadores no peptídicos que conectan las diferentes porciones de la proteína.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de una cualquiera de las inmunoglobulinas (p. ej., inmunocitocinas) descritas en la presente memoria y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar el cáncer (o asistir en el tratamiento del cáncer) en un sujeto. En algunas realizaciones, un método incluye administrar una proteína de fusión de inmunoglobulina descrita en la presente memoria (p. ej., una inmunocitocina) a un sujeto que tiene cáncer, en donde la proteína de fusión de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor. En algunas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor se expresa en la superficie extracelular de una célula tumoral del cáncer. En algunas realizaciones, el método también incluye determinar que el antígeno asociado a un tumor se expresa en la superficie extracelular de una célula tumoral del cáncer. En algunas realizaciones, el antígeno asociado a un tumor es un antígeno de matriz extracelular, un antígeno específico para vasculatura o un antígeno específico para macrófagos.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina es una inmunocitocina y el péptido de fusión de citocina induce linfocitos citolíticos naturales o linfocitos T citotóxicos.

En algunas realizaciones, un cáncer que se trata es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, melanoma, osteosarcoma, neuroblastoma, o cualquier otro cáncer (p. ej., un cáncer para el cual se puede identificar un antígeno específico para el cáncer y se puede dirigir la porción de anticuerpo de la proteína de fusión de anticuerpo).

En algunas realizaciones, se proporciona un método para promover la ADCC en un sujeto, al administrar una proteína de fusión de inmunoglobulina (p. ej., una inmunocitocina) descrita en la presente memoria a un sujeto. En algunas realizaciones, se proporciona un método para potenciar una respuesta inmunitaria dirigida a células en un sujeto, al administrar una proteína de fusión de inmunoglobulina (p. ej., una inmunocitocina) descrita en la presente

5 memoria a un sujeto, en donde la proteína de fusión de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno que se expresa en la superficie extracelular de una célula en el sujeto. En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral y el antígeno es un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, también se administra un segundo compuesto anticanceroso (p. ej., simultáneamente, concurrentemente, antes y/o después de un régimen de tratamiento con inmunoglobulina). En algunas realizaciones, el segundo compuesto anticanceroso es un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el sujeto se trata adicionalmente (p. ej., concurrentemente, antes y/o después) con radiación. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina o composición se administra subcutáneamente. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina o composición se administra subcutáneamente a una dosificación menor que 50 mg por metro cuadrado. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de inmunoglobulina o composición se administra a una frecuencia de una vez por semana, una vez cada dos semanas o con menor frecuencia.

15 Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporcionan métodos para potenciar una respuesta inmunitaria dirigida a células en un sujeto mediante el uso de una inmunocitocina descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una cualquiera de las inmunocitocinas descritas en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la inmunocitocina se une específicamente a un antígeno que se expresa en la superficie extracelular de una célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral y el antígeno es un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, la célula es un linfocito B y el antígeno es un antígeno de linfocito B (p. ej., CD20 u otro antígeno adecuado). En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden: administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una cualquiera de las inmunocitocinas descritas en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la inmunocitocina se une específicamente a un antígeno tumoral que se expresa en la superficie extracelular de una célula tumoral del cáncer. En algunas realizaciones, los métodos comprenden determinar que un antígeno tumoral se expresa en la superficie extracelular de una célula tumoral del cáncer; y administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una cualquiera de las inmunocitocinas descritas en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la inmunocitocina se une específicamente al antígeno tumoral. En algunas realizaciones, los métodos comprenden, además, administrar un compuesto anticanceroso distinto de la inmunocitocina en combinación con la composición farmacéutica. En algunas realizaciones, los métodos comprenden, además, someter al sujeto a uno o más tratamientos adicionales, por ejemplo, pero sin limitarse a, quimioterapia previa o concurrente, cirugía de tumor, radiación local, ablación por radiofrecuencia u otro tratamiento para el tumor local basado en temperatura. En ciertas realizaciones, el tratamiento adicional se proporciona después de uno o más ciclos de tratamiento con inmunocitocina.

35 En algunas realizaciones, un sujeto que se trata tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia, mieloma múltiple, melanoma, sarcoma y neuroblastoma. Sin embargo, se debe apreciar que se pueden tratar otros cánceres o tumores según se describe en la presente memoria.

40 En algunas realizaciones, una proteína de fusión de inmunoglobulina descrita en la presente memoria incluye una porción de anticuerpo en donde la cadena ligera se fusiona a un agente para generación de imágenes, un agente citotóxico o un agente citostático.

Estos y otros aspectos de la invención y descripción se ilustran adicionalmente mediante la siguiente descripción y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 es una ilustración de un anticuerpo y cambios estructurales que se producen después de la unión a una célula diana que expresa el antígeno;

La Figura 2 ilustra una citocina fusionada al extremo C de una cadena pesada de anticuerpo (panel izquierdo) y una citocina fusionada al extremo C de una cadena ligera de anticuerpo (panel derecho);

50 La Figura 3 es una ilustración de una inmunocitocina que tiene IL2 fusionado al extremo C de la cadena ligera y los cambios estructurales que se producen después de la unión a una célula diana que expresa el antígeno;

La Figura 4 ilustra una realización de una proteína IL2 que muestra la ubicación de D20;

La Figura 5 muestra la unión de una construcción de fusión a través de cadena ligera a un anticuerpo antiidiotípico y anticuerpos anti-IL2 en un ELISA;

55 La Figura 6 muestra la actividad de ADCC de una proteína de fusión a través de cadena ligera y una proteína de fusión a través de cadena pesada;

La Figura 7 muestra las actividades de CDC relativas de una proteína de fusión a través de cadena ligera (fusión a través de L), el anticuerpo natural (sin una fusión con citocina) y proteínas de fusión a través de cadena pesada correspondientes (fusión a través de H (por sus siglas en inglés));

5 La Figura 8 muestra la bioactividad de IL2 relativa de la IL2 fusionada al extremo C de una región constante de cadena ligera y IL2 recombinante (no fusionada a una citocina);

La Figura 9 muestra el perfil farmacocinético relativo de una proteína de fusión por L y una proteína de fusión por H;

La Figura 10 muestra la biodisponibilidad subcutánea de una proteína de fusión por L y una proteína de fusión por H;

10 La Figura 11 muestra un gel de construcciones de fusión reducidas y no reducidas que demuestran que la construcción de fusión a través de cadena ligera forma heterodímeros completos estabilizados mediante uniones disulfuro entre la cadena L y H y entre las cadenas H; y

La Figura 12 muestra la activación relativa de receptores con afinidad intermedia y alta con diferentes construcciones de fusión unidas a perlas recubiertas con antígeno.

Descripción detallada de la invención

15 En algunas realizaciones, se proporcionan nuevas proteínas de fusión de anticuerpo útiles para dirigir péptidos de fusión a tejidos específicos en sujetos. Las realizaciones descritas en la presente memoria son útiles para dirigirse a células enfermas (p. ej., células cancerosas) en humanos y animales no humanos. Los anticuerpos se pueden fusionar a citocinas (p. ej., para formar inmunocitocinas para aplicaciones terapéuticas), moléculas para generación de imágenes (p. ej., para aplicaciones de generación de imágenes dirigidas) y/o moléculas radioetiquetadas (p. ej., para radioterapia dirigida). Se debe apreciar que, en algunas realizaciones, las inmunocitocinas también se pueden radioetiquetar.

20 Los aspectos se basan, al menos en parte, en las propiedades inesperadas de anticuerpos que tienen una cadena ligera fusionada, a través del extremo C, al extremo N de un péptido de fusión (p. ej., una citocina u otro péptido de fusión). En algunas realizaciones, las fusiones en el extremo C a la cadena ligera de un anticuerpo (ver, por ejemplo, la Figura 2) no alteran las funciones efectoras (p. ej., las funciones de ADCC y CDC de un anticuerpo IgG1) o la función del péptido de fusión (p. ej., citocina). Además, los anticuerpos que tienen una fusión en el extremo C en la cadena ligera demuestran una mayor semivida en suero y biodisponibilidad subcutánea. Por consiguiente, los anticuerpos que tienen una fusión en el extremo C en la cadena ligera se pueden usar para suministrar un péptido de fusión (p. ej., una citocina) de manera más eficaz y en dosis más bajas que anticuerpos que tienen una fusión en el extremo C en la cadena pesada.

30 En algunas realizaciones, las inmunocitocinas que comprenden un anticuerpo que tiene una citocina fusionada al extremo C de la cadena ligera tienen mejores propiedades clínicas con respecto a las inmunocitocinas que comprenden un anticuerpo que tiene una citocina fusionada al extremo C de la cadena pesada. Las inmunocitocinas que comprenden una citocina fusionada a la cadena pesada del anticuerpo exhiben unión a antígeno normal y ADCC normal. Sin embargo, la fusión al extremo C altera la estructura de la región Fc, incluso cuando se usa un enlazador peptídico flexible. En consecuencia, las inmunocitocinas que tienen una fusión en la cadena pesada exhiben baja destrucción por complemento (CDC) con respecto a los anticuerpos intactos. Además, las fusiones de inmunocitocina a través de cadena pesada se caracterizan por alta unión al receptor Fc (FcR) en ausencia de unión a antígeno. Esto da como resultado una semivida relativamente corta. Estas propiedades de fusiones de inmunocitocina a través de cadena pesada se pueden alterar, por ejemplo, para reducir o eliminar la unión a FcR al desglucosilar la inmunocitocina y/o evitar la proteólisis intracelular al modificar el enlazador. Sin embargo, la desglucosilación da como resultado una pérdida de ADCC y CDC, y las construcciones con enlazador modificado todavía tienen una CDC relativamente baja y propiedades farmacocinéticas subóptimas.

45 En cambio, las inmunocitocinas que tienen una fusión a través de la cadena ligera conservan las funciones del anticuerpo intacto y la citocina, incluso sin un enlazador péptido. Por ejemplo, las fusiones de inmunocitocina a través de cadena ligera exhiben unión a antígeno, ADCC, actividad de citocina normales, mejor CDC y aclaramiento reducido mediante células que llevan el receptor FcR. En algunas realizaciones, sin ánimo de ceñirse a una teoría, las fusiones a través de la cadena ligera evitan distorsiones de la cadena pesada y esto da como resultado una degradación disminuida después de la captación por células que llevan FcR con el posterior reciclaje hacia fuera de la célula.

50 En algunas realizaciones, las fusiones de inmunocitocina a través de la cadena ligera se basan en anticuerpos IgG (p. ej., IgG1 o IgG3). Un anticuerpo IgG es un tetrámero que incluye dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, cada cadena pesada está enlazada a la otra cadena pesada y también a una cadena ligera. Cada cadena pesada incluye una región variable (V_H) de extremo N enlazada a una región constante (C_H) de extremo C. Las dos cadenas pesadas están enlazadas entre sí a través de una o más uniones disulfuro entre las respectivas regiones CH. Cada cadena ligera incluye una región variable (V_L) de extremo N enlazada a una región constante (C_L) de extremo C. La cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda, dependiendo de sus regiones V_L y C_L . Una cadena ligera kappa incluye una región V_k y una C_k , mientras que una cadena ligera lambda incluye una región V_λ y

una C_λ. Cada cadena pesada está enlazada a una cadena ligera a través de una o más uniones disulfuro entre la región C_H y la región C_L (p. ej., C_K).

Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo determinan la especificidad para el antígeno y la afinidad del anticuerpo. Juntas, las regiones C_H, en parte, definen la porción Fc del anticuerpo que es capaz de dirigir funciones efectoras de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Se debe apreciar que, en algunas realizaciones, un péptido se fusiona al extremo C de la cadena ligera de un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, en un anticuerpo quimérico, las regiones V_H y V_L de un primer anticuerpo (p. ej., específicas para un primer antígeno, y/o de una primera especie o tipo de anticuerpo) se sustituyen por las regiones V_H y V_L de un segundo anticuerpo (p. ej., específicas para un segundo antígeno, y/o de una segunda especie o tipo de anticuerpo), mientras conservan la porción Fc del segundo anticuerpo, lo que da como resultado un anticuerpo con la especificidad de antígeno (y otras propiedades, p. ej., inmunogenicidad, etc.) del primer anticuerpo y las características de función efectora del segundo anticuerpo.

Se debe apreciar que se puede usar cualquier especie de regiones variable y constante. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera son humanas o humanizadas. En algunas realizaciones, las regiones variable y constante son humanas o humanizadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir una cadena pesada de humano, ratón, vaca, perro o gato y una cadena ligera de humano, ratón, vaca, perro o gato o una porción de estas (p. ej., una región constante kappa o lambda). En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser quiméricos e incluyen una región variable de una primera especie y una región constante de una segunda especie. Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir una región variable de un anticuerpo de ratón (opcionalmente humanizada o canonizada) fusionada a una región constante de un anticuerpo humano. Se han identificado regiones variables de ratón para muchos antígenos diferentes. Dado que la mayoría de los anticuerpos de ratón tienen cadenas ligeras kappa, una región variable de cadena ligera de ratón debería fusionarse generalmente a una región constante kappa de un anticuerpo humano para una estabilidad y rendimiento óptimos de los anticuerpos de ratón/humano recombinantes. Sin embargo, en algunas realizaciones, una región variable de ratón puede fusionarse a una región constante lambda.

En algunas realizaciones, las inmunocitocinas incluyen una cadena ligera que tiene una región variable (p. ej., una región variable de ratón, región variable de perro, una región variable humanizada, o cualquier otra región variable adecuada) fusionada a una región constante (p. ej., de longitud completa, o que contiene una o más mutaciones y/o eliminaciones puntuales) fusionada a una citocina o una porción de esta. La cadena ligera recombinante se puede combinar con una cadena pesada (p. ej., una cadena pesada recombinante). La cadena ligera recombinante puede ser una región constante de cadena ligera lambda o kappa. En algunas realizaciones, cuando la región variable es una región variable kappa, se puede seleccionar una región constante kappa (aunque se podría usar una región constante lambda en algunas realizaciones).

En algunas realizaciones, se proporcionan inmunocitocinas que se unen específicamente a antígenos asociados a un tumor. Según se usa en la presente memoria, el término "antígeno asociado a tumor" se refiere a una sustancia producida directamente o indirectamente por una célula tumoral que induce una respuesta inmunitaria específica en un hospedante a la sustancia. Típicamente, el antígeno tumoral se expresa en la superficie extracelular de una célula tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno humano, un homólogo no humano de un antígeno asociado a un tumor humano o cualquier otro antígeno asociado a un tumor no humano. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es GD2-gangliósido, CD19, CD20, EPCAM o CSPG4. Otros antígenos tumorales adecuados incluyen, por ejemplo, p185 HER2/neu (erb-B1; Pisk et al., J. Exp. Med., 181:2109-2117 (1995)); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) (Harris et al., Breast Cancer Res. Treat., 29: 1-2 (1994)); antígenos carcinoembrionarios (CEA, por sus siglas en inglés) (Kwong et al., J. Natl. Cancer Inst., 85:982-990 (1995)); mucinas mutadas asociadas a carcinoma (productos génicos de MUC-1; Jerome et al., J. Immunol., 151:1654-1662 (1993)); proteínas E7 y E6 de papilomavirus humano (Ressing et al., J. Immunol., 154:5934-5943 (1995)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, por sus siglas en inglés, Israeh, et al., Cancer Res., 54:1807-1811 (1994)); y epítomos o antígenos idiotípicos, por ejemplo, idiotipos de inmunoglobulina o idiotipos de receptor de linfocito T (Chen et al., J. Immunol., 153: 4775-4787 (1994)).

Sin embargo, se debe apreciar que la invención y descripción no se limitan a inmunocitocinas que se unen a antígenos tumorales. Por ejemplo, se pueden tratar enfermedades autoinmunitarias (p. ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, psoriasis, etc.) mediante el uso de una inmunocitocina que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de una célula que media una respuesta autoinmunitaria (p. ej., un antígeno CD20, alfa-4 (α4) integrina, CD11a, etc.).

En ciertas realizaciones, se proporcionan inmunocitocinas dirigidas a uno o más antígenos víricos en la superficie de células infectadas de manera activa o latente para el tratamiento de infecciones víricas persistentes tales como VIH/SIDA. Por ejemplo, se puede tratar el reservorio vírico del VIH con una inmunocitocina dirigida a un epítomo conservado en la proteína gp41 del VIH unida a la membrana y llevar así a la destrucción de las células infectadas de manera latente que expresan este antígeno. Asimismo, proteínas víricas similares expresadas en la superficie de otras células infectadas víricamente (p. ej., células infectadas por el virus de la hepatitis) pueden ser diana de una inmunocitocina que se une específicamente a dicho antígeno.

Según se usa en la presente memoria, el término "unirse específicamente" significa que la inmunocitocina o anticuerpo recombinante es capaz de unirse específicamente a su antígeno diana en presencia del antígeno en condiciones de unión adecuadas conocidas para el experto en la técnica. En algunas realizaciones, la inmunocitocina o anticuerpo recombinante tiene una constante de afinidad, K_a en un intervalo de 10^7 M^{-1} a 10^8 M^{-1} , 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} , 10^9 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} , 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} , o 10^{11} M^{-1} a 10^{12} M^{-1} . En algunas realizaciones, las inmunocitocinas o anticuerpo recombinante tiene una constante de afinidad, K_a de al menos 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} , al menos 10^{11} M^{-1} o al menos 10^{12} M^{-1} .

En algunas realizaciones, "unirse específicamente" significa que al menos 90 por ciento, al menos 95 por ciento, al menos 98 por ciento o al menos 99 por ciento de los complejos inmunitarios anticuerpo-antígeno formados cuando el anticuerpo se pone en contacto con una fuente de antígenos, en condiciones adecuadas para la formación de complejos inmunitarios, incluye un antígeno especificado. Por ejemplo, se dice que la inmunocitocina descrita en la presente memoria se une específicamente a GD2 cuando al menos 90 por ciento de los complejos inmunitarios anticuerpo-antígeno formados cuando la inmunocitocina que contiene el anticuerpo se pone en contacto con una fuente de antígenos, en condiciones adecuadas para la formación de complejos inmunitarios, incluye GD2.

En algunas realizaciones, las inmunocitocinas descritas en la presente memoria se pueden usar para aplicaciones veterinarias. Por ejemplo, se pueden proporcionar proteínas de fusión de inmunocitocina a través de cadena ligera para destruir células malignas que expresan antígeno en perros, gatos u otros animales no humanos. Las inmunocitocinas descritas en la presente memoria se pueden usar en animales no humanos para caracterizar su eficacia clínica *in vivo*. Los datos preclínicos obtenidos de dichos estudios son útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos para su uso en medicina veterinaria, así como el desarrollo y uso adicional de inmunocitocinas en sujetos humanos en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que contienen regiones variable y constante de cadena ligera de diferentes especies (*p. ej.*, una región variable de ratón, sea humanizada o no, y una región constante de perro) son más estables y/o tienen características de rendimiento más alto cuando las regiones variable y constante son del mismo isotipo (*p. ej.*, combinadas para que sean ambas kappa o lambda). Las cadenas ligeras de anticuerpo de ratón son típicamente cadenas ligeras kappa, mientras que las cadenas ligeras de anticuerpo de perro son típicamente cadenas ligeras lambda. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una región variable de ratón (*p. ej.*, una región variable kappa de ratón) se fusiona a una región constante kappa de perro.

En algunas realizaciones, el aminoácido del extremo C de al menos una cadena ligera de un anticuerpo se enlaza covalentemente al aminoácido del extremo N de un péptido de fusión (*p. ej.*, una citocina). En algunas realizaciones, el aminoácido del extremo C de ambas cadenas ligeras de un anticuerpo se enlaza covalentemente al aminoácido del extremo N de un péptido de fusión (*p. ej.*, una citocina). En algunas realizaciones, el aminoácido del extremo C de una o ambas cadenas ligeras de un anticuerpo se enlaza genéticamente al aminoácido del extremo N de un péptido de fusión (*p. ej.*, una citocina).

Se debe apreciar que las porciones de cadena ligera, cadena pesada y citocina de las inmunocitocinas se pueden conectar con o sin un enlazador intercalado (*p. ej.*, enlazador peptídico).

En algunas realizaciones, una sustitución o eliminación del residuo Cys del extremo C en una región constante de cadena ligera da como resultado una proteína no funcional o escasamente funcional (*p. ej.*, debido a la ausencia de la unión Cys-Cys correspondiente entre la cadena pesada y ligera). Por consiguiente, en algunas realizaciones, una inmunocitocina que tiene una fusión de cadena ligera en el extremo C conserva la Cys del extremo C de la región constante de cadena ligera.

Se muestra una representación esquemática de una realización de una inmunocitocina en la Figura 3. Según se ilustra en la Figura 3, se produce un cambio estructural en el anticuerpo después de la unión a una célula que expresa un antígeno diana. En algunas realizaciones, este cambio estructural puede desenmascarar la proteína de fusión (*p. ej.*, citocina) y aumentar así su actividad. En disolución, los anticuerpos tienen una forma en la que el extremo C de cada región constante de cadena ligera se empuja hacia la hendidura en la región bisagra de la cadena pesada. Cuando el anticuerpo se une a un antígeno multimérico (*p. ej.*, en una superficie celular) los brazos del Fab pasan a una configuración que expone la región bisagra para interacción con otras proteínas. En algunas realizaciones, este cambio de configuración se puede usar para exponer un péptido de fusión, por ejemplo, una citocina, o una porción de esta (por ejemplo, una región de unión a receptor, sitio activo u otra región funcional) que está fusionado al extremo C de la cadena ligera. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la especificidad de la citocina se puede potenciar adicionalmente al crear fusiones de inmunocitocina a través de cadena ligera en donde la citocina es inactiva, o relativamente inactiva en ausencia de unión a una célula diana (*p. ej.*, la actividad se enmascara por el pliegue de la porción de anticuerpo de la inmunocitocina), y en donde la actividad de la citocina aumenta después de la unión al antígeno (*p. ej.*, unión a un antígeno en una superficie celular).

En algunas realizaciones, se pueden usar citocinas mutantes o alteradas con actividad reducida, por ejemplo, en una construcción que enmascara la actividad de la citocina en la ausencia de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, el efecto de enmascaramiento se puede aumentar al modificar una citocina. Por ejemplo, uno o más (p. ej., 1-5, 5-10, etc.) aminoácidos del extremo N de una citocina se pueden eliminar para producir una inmunocitocina caracterizada por el blindaje o enmascaramiento de la citocina mediante la porción de anticuerpo en la ausencia de unión a antígeno. En algunas realizaciones, esto reduce la distancia entre la unión Cys del extremo C de la cadena ligera a la cadena H y la primera hélice alfa de la citocina que generalmente contiene un residuo de contacto de unión a receptor fundamental (p. ej., Asp20 en IL2 y residuos Asp análogos en otras citocinas relacionadas como IL-21 e IL15), y reduce así adicionalmente el acceso a este sitio en la configuración no unida, pero no en la unida.

Ciertas realizaciones se refieren a proteínas aisladas y ácidos nucleicos que codifican las proteínas. Según se usa en la presente memoria, una molécula aislada es una molécula que es sustancialmente pura y está libre de otras sustancias con las cuales se encuentra habitualmente en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en una medida práctica y adecuada para su uso previsto. En particular, las especies moleculares son suficientemente puras y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de células hospedantes para que sean útiles, por ejemplo, para producir preparaciones farmacéuticas o para secuenciación si la especie molecular es un ácido nucleico, péptido o polipéptido.

También se proporcionan vectores útiles para la expresión de una inmunocitocina descrita en la presente memoria. En una realización, el vector de expresión es adecuado para su uso en células hospedantes de mamífero. Los vectores de expresión de mamífero pueden incluir elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados enlazados al gen que se va a expresar, y otras secuencias flanqueadoras hacia 5' o 3' no transcritas y secuencias hacia 5' o 3' no traducidas, tales como sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los promotores y potenciador usados comúnmente derivan de Polyoma, Adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Se pueden usar secuencias de ADN derivadas del genoma vírico de SV40, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor precoz y tardío, el potenciador, los sitios de empalme y poliadenilación, para proporcionar los otros elementos genéticos necesarios para la expresión de una secuencia de ADN heteróloga. Una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria se puede insertar en un vector de expresión adecuado mediante el uso de métodos estándares de biología molecular que no necesitan descripción adicional en la presente memoria. El vector de expresión puede incluir un promotor o elemento promotor/potenciador que se ubica antes de la molécula de ácido nucleico codificante que se inserta en el vector. Los vectores de expresión pueden incluir opcionalmente al menos una región codificante para un marcador de selección y/o elemento de amplificación génica, p. ej., dihidro reductasa (DHFR).

Para la expresión de una inmunocitocina descrita en la presente memoria, se puede introducir un vector o vectores que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican los diversos polipéptidos de la inmunocitocina en una célula hospedante o población de células hospedantes adecuada.

El vector o vectores se pueden introducir en una célula o células hospedantes mediante el uso de cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, electroporación, suministro biolístico (p. ej., mediante el uso de un cañón de genes), lipofección, precipitación de fosfato cálcico, microinyección, transducción vírica, nucleofección, sonoporación, magnetofección y choque térmico. Dichos métodos son conocidos para los expertos en la técnica y no es necesario describirlos en la presente memoria. Después de la introducción del vector o vectores en la célula o células hospedantes, la célula o células se mantienen en condiciones fisiológicamente adecuadas que son adecuadas para el cultivo celular *in vitro*, durante un período de tiempo suficiente para permitir que la célula o células expresen la inmunocitocina.

Según se usa en la presente memoria, una célula hospedante es una célula eucariota. En algunas realizaciones, la célula hospedante es una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, la célula hospedante es una línea celular de mamífero. En algunas realizaciones, la línea celular de mamífero es un mieloma que no secreta Ig tal como NS/O o Sp2/O-Ag14. En algunas realizaciones, la línea celular de mamífero es HEK293. En ciertas realizaciones, la línea celular de mamífero es una línea de ovario de hámster chino (CHO). Estas y otras células hospedantes adecuadas están disponibles en la Colección estadounidense de cultivos tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) (Manassas, VA).

En algunas realizaciones, células que contienen el vector o vectores de expresión secretan una inmunocitocina en el medio de cultivo. La inmunocitocina expresada secretada se puede aislar sin inconvenientes a partir del cultivo mediante centrifugación (para retirar células) y posterior separación por inmunoespecificidad, por ejemplo, mediante el uso de cromatografía con proteína A o proteína G y/o mediante el uso de antígenos específicos a los cuales se une la inmunocitocina. En algunas realizaciones, la separación por inmunoespecificidad puede implicar alternativamente o adicionalmente un anticuerpo anticitocina, p. ej., un anticuerpo anti-IL2, como el reactivo de inmunoespecificidad.

También se proporcionan composiciones que incluyen una inmunocitocina descrita en la presente memoria. En una realización, la composición es una composición farmacéutica que incluye una inmunocitocina descrita en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para administración a un humano u otro animal

vertebrado. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también se pueden combinar con otros compuestos y entre sí, de tal manera que no hay una interacción que alteraría sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

5 Las inmunocitocinas descritas en la presente memoria se puede usar para tratar cánceres (p. ej., cánceres que expresan GD2) en humanos y animales no humanos (p. ej., perros, gatos, etc.). Según se usa en la presente memoria, "cáncer" se refiere a un crecimiento anormal no controlado de células en un sujeto. El término "cáncer" según se usa en la presente memoria puede referirse a tumores sólidos, cánceres primarios, así como metastásicos, así como cánceres hematógenos ("líquidos"). En algunas realizaciones, los cánceres que expresan antígeno son
10 cánceres que tienen un antígeno detectable (p. ej., GD2) expresado en su superficie celular. Los cánceres que expresan GD2 son generalmente cánceres de origen neuroectodérmico y pueden incluir específicamente, sin limitación, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma y cáncer de pulmón microcítico.

Según se usa en la presente memoria, "tratar" significa enlentecer o detener la progresión o reducir o eliminar, una enfermedad en un sujeto que tiene la enfermedad. Un sujeto que tiene una enfermedad es un sujeto que tiene al
15 menos una manifestación objetivamente identificable de la enfermedad.

Según se usa en la presente memoria, una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para conseguir un efecto biológico deseado. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, al elegir entre los diversos compuestos activos y sopesar factores tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos secundarios adversos y modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento terapéutico eficaz que no provoca toxicidad sustancial y es
20 todavía eficaz para tratar al sujeto en particular. La cantidad eficaz para una aplicación específica puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se va a tratar, el agente activo específico que se va a administrar, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un agente activo específico y/u otro agente terapéutico sin
25 necesidad de experimentación indebida. Se prefiere, generalmente, que se use una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según la opinión médica, aunque este no sea necesariamente el caso para agentes inmunoestimulantes. Se pueden contemplar múltiples dosis por semana para lograr niveles sistémicos adecuados de compuestos. Los niveles sistémicos adecuados se pueden determinar, por ejemplo, al medir los niveles en plasma máximos o sostenidos del fármaco en el sujeto.

30 "Dosis" y "dosificación" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. Generalmente, la dosificación depende de la biología de la molécula de fusión y sus efectos farmacodinámicos. Por ejemplo, las inmunocitocinas que contienen IL2 causan un período corto de linfopenia debido a la marginación de células que llevan el receptor de IL2 fuera de la circulación, con una linfocitosis de recuperación de células que tienen un gran aumento del receptor de IL2 y son capaces de provocar aclaramiento mediado por receptor de inmunocitocina administrada
35 adicionalmente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona una dosificación inicial durante un período de dos o tres días consecutivos y después no más durante varias semanas (p. ej., aproximadamente dos a tres semanas). En algunas realizaciones (p. ej., para inmunocitocinas que contienen IL2), las dosis de compuestos activos serán de aproximadamente 0,05 mg por metro cuadrado a aproximadamente 50 mg por metro cuadrado, dependiendo de la vía de administración. Se espera que dosis intravenosas que varían de 0,05 a 10 mg por metro cuadrado por día, durante uno o varios días, o alternativamente una vez por semana, proporcionen los resultados
40 deseados. De manera similar, se espera que dosis subcutáneas en el intervalo de 1 a 100 mg por metro cuadrado por día, durante uno o varios días, o alternativamente una vez por semana (o con menor frecuencia) proporcionen los resultados deseados. En otras realizaciones, cuando la proteína fusionada tiene propiedades biológicas diferentes y toxicidad vascular más baja que IL2 (o cuando la actividad de la proteína fusionada, p. ej., IL2, se ha reducido) se pueden usar dosis más altas. La dosificación se puede ajustar de manera adecuada para lograr niveles de fármaco deseados, locales o sistémicos, dependiendo del modo de administración. En el caso de que la respuesta en un sujeto sea insuficiente con dichas dosis, se pueden emplear dosis incluso más altas (o dosis más altas eficaces mediante una vía de suministro diferente, más localizada) en la medida que la tolerancia del paciente lo permita. Se contemplan múltiples dosis por día para lograr niveles sistémicos adecuados de compuestos.

50 Para cualquier inmunocitocina descrita en la presente memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de modelos de animales. También se puede determinar una dosis terapéuticamente eficaz a partir de datos de humanos para inmunocitocinas que se han evaluado en humanos y para compuestos que se sabe que exhiben actividades farmacológicas similares, tales como otros agentes activos relacionados. La dosis aplicada se puede ajustar en función de la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. El
55 ajuste de la dosis para lograr la eficacia máxima en función de los métodos descritos anteriormente y otros métodos que se conocen en la técnica está entre las capacidades del experto en la técnica.

En algunas realizaciones, la inmunocitocina se puede administrar en combinación con un anticuerpo terapéutico. En algunas realizaciones, la inmunocitocina descrita en la presente memoria se puede administrar junto con al menos un otro agente para tratamiento anticanceroso o modalidad de tratamiento anticancerosa para tratar el cáncer. Según se usa en la presente memoria, "junto con" o "en combinación con" se refiere a cualquier forma adecuada de
60 politerapia, por ejemplo, tratamientos simultáneos, superpuestos y/o secuenciales. Los agentes de tratamiento

- anticancerosos (p. ej., compuestos anticancerosos) y modalidades de tratamiento anticancerosas distintas del tratamiento con una inmunocitocina descrita en la presente memoria pueden incluir quimioterapia (incluida quimioterapia de combinación), tratamiento por radiación, cirugía, otra inmunoterapia (p. ej., vacunas para el cáncer) y cualquier combinación de estos. También puede incluir la adición de uno o más tratamientos dirigidos que inhiben
- 5 vías de señalización específicas (p. ej., sunitinib, imatinib, erlotinib, etc.), que reducen el crecimiento de células tumorales, así como la inmunosupresión inducida por el tumor. En algunas realizaciones, el tratamiento anticanceroso es radiación local o ablación por radiofrecuencia. Se pueden usar tratamientos anticancerosos tales como ciclofosfamida, doxorubicina, valinomicina, tratamiento hormonal u otros tratamientos descritos en la presente memoria o conocidos de cualquier otra manera en la técnica.
- 10 Según se usa en la presente memoria, un "compuesto anticanceroso" se refiere a un agente que se administra a un sujeto con el objetivo de tratar un cáncer. Los compuestos anticancerosos incluyen, pero no se limitan a, compuestos antiproliferativos, compuestos antineoplásicos, agentes de potenciación complementaria anticancerosos y agentes radioactivos. Un experto en la técnica está familiarizado con una variedad de compuestos anticancerosos. Los ejemplos de compuestos anticancerosos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Acivicina; Aclarrubicina;
- 15 Clorhidrato de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Adriamicina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramincina; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Bendamustina; Bortezimib; Buniodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfpan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de Carrubicina; Carzelesina;
- 20 Cedefingol; Clorombucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; DACA (N-[2-(Dimetil-amino) etil] acridina-4-carboxamida); Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorubicina; Daunomicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Ifesilato de Dezaguanina; Diazicuona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato;
- 25 Epiropidina; Clorhidrato de Epirubicina; Erbulozol; Clorhidrato de Esorubicina; Estramustina; Fosfato Sódico de Estramustina; Etanidazol; Aceite I 131 Etiodizado; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; 5-FdUMP; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-nl; Interferón Alfa-n3;
- 30 Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-lb; Iproplatino; Clorhidrato de Irinotecán; Acetato de Lanreótido; Letrozol; Acetato de Leuprólido; Clorhidrato de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedepa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina, Mitosper; Mitotano; Clorhidrato de Mitoxantrona; Ácido micofenólico; Nocodazol; Nogalamincina; Ormaplatino; Oxisurano; Paclitaxel Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Puposulfán; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfimer Sódico; Porfíromicina; Prednimustina; Clorhidrato de Procarbazine; Puromicina; Clorhidrato de Puromicina; Pirazofurina; Revlimid; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtraceno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Clorhidrato de Espirogermanio; Espiromustina;
- 40 Espiroplatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalán Sódico; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Timitaq; Tiazofurina; Tirapazamina; Tomudex; TOP-53; Clorhidrato de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredepa; Vapreótido; Verteporfina; Vinblastina; Sulfato de Vinblastina; Vincristina; Sulfato de Vincristina, Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Clorhidrato de Zorubicina; 2-Clorodesoxiadenosina; 2'-Desoxiformicina; 9-aminocampototecina; raltitrexed; Ácido N-propargil-5, 8-dideazafólico, 2-cloro-2'-arabino-fluoro-2'-desoxiadenosina; 2-cloro-2'-desoxiadenosina; anisomicina; tricostatina A; hPRL-G129R; CEP-751; linomida; Isetionato de Piritrexim; Sitoglúsido; Clorhidrato de Tamsulosina y Pentomona. También se pueden usar agentes radioactivos. Los ejemplos de agentes radioactivos incluyen, pero no se limitan a, Fibrinógeno I 125; Fludesoxiglucosa F18; Fluorodopa F 18; Insulina I 125; Insulina I 131; Yobenguano I 123; Yodipamida Sódica I 131; Yodoantipirina I 131; Yodocolesterol I 131; Yodohipurato Sódico I 123; Yodohipurato Sódico I 125; Yodohipurato Sódico I 131; Yodopiracet I 125; Yodopiracet I 131; Clorhidrato de Yofetamina I 123; Yometina I 125; Yometina I 131; Yotalamato Sódico I 125;
- 55 Yotalamato Sódico I 131; Yotirosina I 131; Liotironina I 125; Liotironina I 131; Acetato de Merisoprol Hg 197; Acetato de Merisoprol - Hg 203; Merisoprol Hg 197; Selenometionina Se 75; Coloide de Trisulfuro de Antimonio de Tecnecio Tc 99m; Bicisato de Tecnecio Tc 99m; Disofenina de Tecnecio Tc 99m; Etidronato de Tecnecio Tc 99m; Exametazima de Tecnecio Tc 99m; Furifosmina de Tecnecio Tc 99m; Gluceptato de Tecnecio Tc 99m; Lidofenina de Tecnecio Tc 99mm; Mebrofenina de Tecnecio Tc 99m; Medronato de Tecnecio Tc 99m; Medronato Disódico de Tecnecio Tc 99m; Mertiatida de Tecnecio Tc 99m; Oxidronato de Tecnecio Tc 99m; Pentetato de Tecnecio Tc 99m; Pentetato Cálculo Trisódico de Tecnecio Tc 99m; Sestamibi de Tecnecio Tc 99m; Siboroxima de Tecnecio 99m; Succímero de Tecnecio Tc 99m; Coloide de Azufre de Tecnecio Tc 99m; Teboroxima de Tecnecio Tc 99m; Tetrafosmina de Tecnecio Tc 99m; Tiatida de Tecnecio Tc 99m; Tiroxina I 125; Tiroxina I 131; Tolpovidona I 131; Trioleína I 125; Trioleína I 131.

En algunas realizaciones, se administra una inmunocitocina en combinación con un protocolo de quimioterapia tradicional, por ejemplo, uno que activa el sistema inmunitario y que no es en sí mismo inmunosupresor (p. ej., uno o más taxanos, doxorubicina, etc., o cualquier combinación de estos), o que reduce la inmunosupresión inducida por el tumor debido a linfocitos T reguladores (p. ej., ciclofosfamida) células supresoras mieloides (p. ej., gemcitabina).

5 Para su uso en tratamiento, las formulaciones descritas en la presente memoria se pueden administrar en disoluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener habitualmente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

10 Los agentes tampón adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

15 Para su uso en el tratamiento, se puede administrar una cantidad eficaz de la inmunocitocina a un sujeto mediante cualquier modo que suministra la inmunocitocina al tejido diana deseado. La administración de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede lograr mediante cualquier medio conocido para el experto en la técnica. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, intravenosa y subcutánea.

20 Los compuestos, cuando se desea suministrarlos sistémicamente, se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o contenedores multidosis, con un conservante agregado. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes para suspender, estabilizar y/o dispersar.

25 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de compuestos activos en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para

30 posibilitar la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Para administración subcutánea, se pueden elegir agentes que no provocan irritación cutánea local. En algunas realizaciones, los agentes son generalmente isotónicos y no contienen niveles altos de detergentes fuertes.

Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

35 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos y Ejemplos de referencia.

Ejemplos y ejemplos de referencia

Ejemplo 1: Inmunocitocinas genéticamente manipuladas que tienen una citocina fusionada al extremo C de una cadena ligera de anticuerpo.

40 En algunas realizaciones, se genomanipula un anticuerpo contra una diana terapéutica para incluir una citocina fusionada al extremo C de la cadena ligera de anticuerpo.

Por ejemplo, se genomanipula un anticuerpo contra GD2 para incluir IL2 fusionada al extremo C de la cadena ligera. El GD2 es un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico, incluidos neuroblastoma y melanoma humanos, con expresión altamente restringida en tejidos normales, principalmente al cerebelo y nervios periféricos en humanos. La expresión relativamente específica para tumores de GD2 lo convierte en una diana atractiva para inmunoterapia, por ejemplo, con anticuerpos monoclonales. Los melanomas, sarcomas y neuroblastomas expresan de manera abundante GD2 en la superficie celular donde es susceptible al ataque inmunitario mediante anticuerpos. La sobreexpresión de GD2 en estos tumores es llamativa, al igual que la frecuencia de respuestas clínicas después del tratamiento del neuroblastoma con anticuerpos monoclonales con GD2. De manera similar a otros tipos de cáncer, las estrategias convencionales para el tratamiento de diversos cánceres positivos para GD2 incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia.

45

50

Se han desarrollado anticuerpos, incluidos anticuerpos monoclonales, para su uso en el tratamiento de cánceres positivos para GD2. Mujoo y colegas informaron sobre un anticuerpo anti-GD2 humano monoclonal murino, designado 14.18, en 1987. Mujoo K et al. (1987) Cancer Res 47:1098-104. Con la aparición de la genomanipulación de anticuerpos, posteriormente se desarrollaron formas quiméricas y humanizadas de 14.18. Gillies S et al. (1989) J Immunol Methods 125:191-202; Mueller BM et al. (1990) J Immunol 144:1382-6. Se halló que un anticuerpo

55

quimérico de ratón-humano, ch14.18, tenían potentes actividades efectoras de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), así como la capacidad de dirigirse a xenoinjertos de células de melanoma positivas para GD2 en ratones. Mueller et al. (*supra*).

5 Se manipula genéticamente una proteína de fusión de anticuerpo anti-GD2-IL2 (inmunocitocina) que tiene IL2 fusionada a la cadena ligera. La inmunocitocina contiene las regiones V de 14.18 de ratón, regiones constantes (C) de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y una secuencia de IL2 humana fusionada al extremo C de la región constante de cadena ligera. La secuencia de IL2 humana se inserta en un vector que contiene las secuencias codificantes de variable pesada (V_H) y variable ligera (V_L) de 14.18 ratón, así como las secuencias codificantes de constantes de cadena pesada y ligera. La secuencia codificante de IL2 se fusiona dentro del marco
10 después y adyacente al codón que codifica el aminoácido del extremo C de la región constante de cadena ligera. En algunas realizaciones, se usa la longitud completa de la secuencia codificante de IL2. En algunas realizaciones, se genomanipula una eliminación, adición o sustitución de uno o varios aminoácidos del extremo N de IL2 y se fusiona dentro del marco al aminoácido del extremo C de la cadena ligera.

15 Por ejemplo, la inmunocitocina se puede producir a partir de un vector que codifica las cadenas pesada y ligera (p. ej., fusiones de cadena ligera) en la misma molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, se incluyen secuencias de empalme junto con intrones entre la secuencia líder usada para cada unidad de transcripción (p. ej., entre las regiones V y C, y entre los dominios de las regiones constantes de cadena pesada. En algunas realizaciones, una o más de las secuencias codificantes son secuencias de ADNc (p. ej., para IL2 u otra citocina). Se debe apreciar que se puede usar cualquier promotor adecuado (p. ej., CMV u otro promotor).

20 Después de que se ensamblan todas las secuencias de ADN mediante el uso del programa DNASTAR Lasergene 8, se verifican todas las secuencias codificantes para garantizar que no hay errores en la codificación de secuencias proteicas correctas durante la fusión de las secuencias de entrada. Las secuencias finales se envían a una organización de suministro por contrato con experiencia en síntesis génica y ensamblaje (p. ej., Blue Sky Biotech, Worcester, MA). Después del ensamblaje, se verifica y corrige la secuencia del plásmido entero, si es necesario.

25 Se pueden someter a prueba múltiples versiones de secuencias codificantes con variaciones en la intersección entre región C de cadena L, u otra modificación en la propia citocina, para determinar la expresión y ensamblaje óptimos en inmunocitocinas. Los ejemplos incluyen las siguientes proteínas de fusión de IL2 cadena ligera donde las variaciones en la secuencia están subrayadas:

SEQ ID NO: 1

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSLTTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstkkqlqle
 hllldlqmilnginnyknpkltrmltffkfympkkatelkhlqlcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisininvivlelkgsettfm
 ceyadetativeflnrwitfsqsiistlt

SEQ ID NO: 2

30 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSLTTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstkkqlqle
 hllldlqmilnginnyknpkltrmltffkfympkkatelkhlqlcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisininvivlelkgsettfm
 ceyadetativeflnrwitfsqsiistlt

SEQ ID NO: 3

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQRVDaptssstk
 ktqlqllehlldlqmilnginnyknpkltrmltkfymppkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkg
 settfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 4

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQRVDaptssstk
 ktqlqllehlldlqmilnginnyknpkltrmltkfymppkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkg
 settfmceyadetativeflnrwitfscsiistlt

5 Las inmunocitocinas resultantes, un dímero de cadena HL de anticuerpo entero que contiene dos moléculas de IL2 por anticuerpo, se producen *in vitro* a partir de células transfectadas con construcciones de expresión que codifican la proteína de fusión de cadena pesada y cadena ligera de inmunocitocina.

Ejemplo 2: Producción de inmunocitocinas genéticamente manipuladas que tienen una citocina fusionada al extremo C de una cadena ligera de anticuerpo.

Se usa ADN de vector de expresión para la expresión transitoria de la proteína en células 293 F humanas (InVitrogen) mediante el uso de protocolos estándares.

10 Antes de generar líneas celulares estables para producción a largo plazo de la inmunocitocina anti-GD2, se somete a prueba la capacidad del vector para expresar la proteína deseada mediante el uso de expresión transitoria y análisis de cantidades pequeñas de la proteína secretada a partir de células transfectadas. Esto se logra al producir cantidades en miligramos del ADN plasmídico a partir del hospedante bacteriano y purificar el ADN mediante el uso de cromatografía de alta resolución. El ADN libre de endotoxina se usa para transfectar células 293F en cultivo de
 15 suspensión y después de varios días de cultivo, los medios de cultivo acondicionados se cosechan. Se incuban una pequeña cantidad con perlas de proteína A Sepharose al mezclar suavemente y después la proteína capturada se eluye en tampón de electroforesis en gel. La mitad de la muestra se trata, además, con agente reductor (β -mercaptoetanol), mientras la otra mitad no. Ambas muestras se calientan y analizan mediante SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) junto con una proteína testigo de inmunoglobulina. Mediante el uso de expresión transitoria de células que no producen Ig y elución con tampón de gel, se puede
 20 someter a prueba la eficacia del proceso de ensamblaje de la proteína de fusión de L-IL2. Esto se debe a que las células 293 son capaces de secretar moléculas completamente ensambladas, así como dímeros de cadena H que no han formado una unión disulfuro con una cadena L, pero que también se unen y eluyen a partir de la proteína A. Una inmunocitocina basada en IL2 ensamblada correctamente migra como una banda simple de alto peso molecular en el gel (~200 Kd) cuando no se reduce, pero se disocia en dos bandas después de la reducción química. Un
 25 dímero de cadena H migró a aproximadamente 100 kD.

De las cuatro secuencias evaluadas inicialmente, dos no tienen secuencia enlazadora entre la Cys del extremo C de la cadena L y las otras dos tienen un espaciador de 4 aminoácidos derivado del extremo C de kappa C de perro. A diferencia de kappa C humana, la cadena ligera de perro tiene estos residuos adicionales agregados después del
 30 residuo Cys. Dado que se sabe que estos residuos no interfieren en el ensamblaje de las cadenas H/L, se pensó, según aspectos descritos en la presente memoria, que podrían promover el mismo proceso cuando se incluyen en una proteína de fusión a través de cadena L. Otra consideración inicial fue el hecho de que la IL2 humana natural tiene una Cys no apareada en la posición 125 y que esta puede interferir o competir por la formación de la unión disulfuro con la Cys ubicada en la intersección de la cadena L y IL2. Para evaluarlo, se construyó una construcción de cada tipo de enlazador con la Cys natural o un residuo Ser en la posición 125. Esta mutación de Cys a Ser se
 35 conoce en la técnica y se incluye en la IL2 disponible comercialmente, Proleukin.

Después de la expresión transitoria de células 293F y el análisis de muestras pequeñas mediante captura en proteína A y elución en SDS que contenía el tampón de gel, las construcciones más expresadas y ensambladas incluyeron aquellas que tienen las secuencias que se muestran en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4. Estas

representan una versión sin enlazador y Cys125 natural (SEQ ID NO: 1) y una versión con el enlazador y Ser125 modificada (SEQ ID NO: 4). Para las otras construcciones, se produjeron cantidades mucho más bajas y una proporción reducida se ensambló en inmunocitocinas intactas.

5 Los cultivos de células transitorios se amplían y se purifican cantidades moderadas de la inmunocitocina para análisis adicionales. Se purifican cantidades en multimiligramos de la inmunocitocina a partir de sobrenadantes de cultivo celular y se capturan mediante el uso de métodos estándares de proteína A Sepharose y cromatografía de intercambio iónico. Este material se usa para establecer un estándar de referencia para ensayos bioquímicos y para la caracterización adicional de propiedades bioquímicas y biofísicas. Las proteínas óptimas están intactas, son completamente solubles a concentración alta (p. ej., mayor que 1 mg/ml) y conservan toda la actividad biológica después de la unión a la proteína A, elución a pH bajo y posterior neutralización con base. El material se usa para establecer métodos de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés) necesarios para los ensayos de identidad y potencia, así como para la medición de la inmunocitocina en muestras biológicas tales como sangre, plasma o suero.

10 En función de la cantidad estimada de inmunocitocina producida por expresión transitoria en células 293 F, se pueden purificar cantidades suficientes de proteína purificada, necesarias para la caracterización y desarrollo de ensayos, a partir de entre 100 ml y 1L de cultivo mediante el uso de matraces de cultivo celular estándares o bolsas flexibles descartables. Se preparan al menos 1-2 mg de proteína purificada para caracterización adicional y desarrollo de ensayos.

15 Las dos construcciones con el nivel más alto de expresión se ampliaron hasta cultivos de 100 ml y todos los sobrenadantes de cultivo se capturaron en proteína A y se eluyeron con pH bajo. Cuando estas inmunocitocinas se caracterizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, solo la construcción que contenía la SEQ ID NO: 1 se dividió en las dos cadenas que representaban las cadenas de fusión de H y L-IL2, mientras que la construcción que contenía la SEQ ID NO: 4 no se disoció lo que indicó que se había desnaturalizado durante la etapa de elución en pH bajo a partir de la columna de proteína A.

20 Además, se puede llevar a cabo la generación de una línea celular estable. La generación de una línea celular estable en células de mieloma de ratón NS/O (u otra línea celular adecuada, por ejemplo, células CHO, etc.) se establece mediante el uso de metotrexato como marcador de selección. Se lleva a cabo mediante el uso de corte por enzima de restricción de ADN plasmídico linealizado dentro del gen de resistencia a la ampicilina (amp^R) bacteriano. Se introduce el ADN en las células de mieloma (u otras células adecuadas) mediante el uso de métodos de electroporación establecidos y las células se cultivan en medio de selección que contiene 0,1 µM de metotrexato. Los clones de mieloma resistentes al fármaco se someten a prueba para determinar la secreción de inmunocitocina usando antisuero adecuados. Los clones con expresión se someten a prueba para determinar la productividad, estabilidad y tasa de crecimiento. Se usa subclonación para seleccionar las propiedades de línea celular óptimas.

25 La proteína expresada, preferiblemente secretada a partir de células cultivadas en medios libres de suero, se purifica mediante el uso de protocolos establecidos para producir proteínas aptas para uso clínico. Se toma un gran cuidado para evitar la contaminación por endotoxina. Las etapas pueden incluir una etapa de concentración (p. ej., filtración por flujo tangencial) con posterior unión y elución a partir de proteína A Sepharose. Después de la elución con pH ácido y la neutralización, se puede usar cromatografía de intercambio iónico como etapa de refinación.

30 La proteína purificada se analiza mediante SDS-PAGE y la posible aglomeración se examina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). Los problemas de estabilidad de la inmunocitocina asociados a la aglomeración se monitorizan de cerca. Se aplican formulaciones de corriente, incluida liofilización, que minimizan los problemas de estabilidad, según sea necesario.

35 Los medios acondicionados de los cultivos (p. ej., cultivos de expresión transitorio o estable) pueden servir como fuente de material de inmunocitocina para análisis bioquímicos para garantizar que se secretan proteínas con el tamaño correcto y que la proteína de fusión de cadena H y cadena L-IL2 se ensambla en una estructura heterodimérica. La inmunocitocina se captura en perlas de proteína A Sepharose y posteriormente se analiza mediante SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida. Se pueden usar muestras de medios para someter a prueba la actividad de unión a antígeno, así como la bioactividad de IL2, mediante el uso de una línea celular de ratón estándar, CTLL-2, en un ensayo de proliferación.

40 Las propiedades farmacocinéticas se pueden determinar en ratones. La inmunocitocina purificada se usa para medir la cinética de concentración con respecto al tiempo después de la dosificación intravenosa en ratones. Se toman muestras de sangre durante un período de 24 horas y se mide la concentración de la inmunocitocina mediante ELISA al medir tanto la porción de anticuerpo como la de enzima-IL2 de la molécula. En algunas realizaciones, la inmunocitocina se captura mediante el uso de antisueros anti-IgG humana y en la etapa de detección se usa un anticuerpo anti-IL2 humana biotinilado. Esto define la cantidad de inmunocitocina intacta presente en las muestras.

45 Ejemplo 3: Estructura de una inmunocitocina que tiene una citocina fusionada a la región constante de cadena ligera:

La Figura 5 muestra que una proteína de fusión que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 se une a un anticuerpo antiidiotípico (1A7) específico para el sitio de unión a antígeno de 14.18 y se detecta en estado unido por un anticuerpo anti-IL2. Este ELISA muestra que IL2 se pliega y expone adecuadamente. Las construcciones evaluadas son hu14.18-IL2 (14.18 humanizado con IL2 fusionada a la cadena pesada); ch14.18-IL2-H (IL2 fusionada a la cadena H, pero con una modificación de enlazador que aumenta la semivida en comparación con hu14.18-IL2); y ch14.18-IL2-L que contiene la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 1 (IL2 fusionada a la cadena ligera según se describe en la presente memoria). La unión al anticuerpo 1A7 imita la unión a GD2 y es un ensayo más fácil de llevar a cabo con regularidad. También indica que las regiones V están en su estado plegado adecuado para la unión a GD2. Sin embargo, también se evalúa la unión a GD2 natural mediante el uso de células tumorales mediante citometría de flujo y cuando se evalúan las funciones efectoras (ADCC y CDC).

La unión al antígeno (p. ej., GD2 u otro antígeno) se puede usar para evaluar la estructura y función de la porción de unión a antígeno de la inmunocitocina. En algunas realizaciones, la unión a GD2 se lleva a cabo mediante el uso de placas de 96 pocillos recubiertas con GD2 (Calbiochem) y bloqueadas con seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) al 5 % y suero de cabra al 5 %. El anticuerpo o sobrenadantes de cultivo que contienen el anticuerpo de prueba se diluyen en PBS que contiene BSA al 1 % y suero de cabra al 1 % y se incuban en pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas no unidas se lavan tres veces con tampón de dilución y la inmunocitocina unida se detecta con antisueros secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) contra la región IgG y/o IL2 de la proteína. La HRP unida se cuantifica mediante protocolos estándares.

Un método alternativo para evaluar la unión a GD2 es incubar la proteína de prueba con una célula cancerosa que expresa GD2 (p. ej., melanoma) y detectar su unión mediante el uso de un anticuerpo etiquetado secundario dirigido contra la porción de inmunoglobulina o citocina.

Se pueden usar ensayos similares para evaluar la unión de otros antígenos.

Ejemplo 4: Actividad de ADCC de una inmunocitocina que tiene una citocina fusionada a la región constante de cadena ligera:

La Figura 6 muestra que la actividad de ADCC de una proteína de fusión a través de cadena ligera es igual a la de una proteína de fusión a través de cadena pesada. Las construcciones evaluadas son una fusión a través de H con un 14.18-IL2 quimérico (ch14.18-IL2-H) y una fusión a través de L con un 14.18-IL2 quimérico (ch14.18-IL2-L). El sistema de prueba es células diana de melanoma humano M21 que expresan GD2 y que están etiquetadas con ⁵¹Cr y PBMC (siglas en inglés para "células mononucleares de sangre periférica") humanas como efectores. Dichas preparaciones celulares contienen aproximadamente 5-10 % de linfocitos citolíticos naturales, los mediadores primarios de la actividad de ADCC *in vitro*.

La capacidad de la inmunocitocina para mediar la función efectora de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) se evaluó mediante el uso de células mononucleares de sangre periférica en diferentes relaciones entre efector y diana y una línea celular de melanoma que expresa GD2 humano. Las células diana se incubaron con ⁵¹Cr y después se lavaron para retirar el isótopo libre. Los linfocitos de sangre periférica aislados a partir de un voluntario humano sano se incubaron con células diana etiquetadas durante 4 horas en ausencia o presencia de cantidades crecientes de la inmunocitocina y se tomó la cantidad de cromo liberado como una medida de la lisis específica.

Ejemplo 5: Actividad de CDC de una inmunocitocina que tiene una citocina fusionada a la región constante de cadena ligera:

La Figura 7 muestra que la actividad de CDC de una proteína de fusión a través de cadena ligera es mucho más alta que la del anticuerpo natural (sin fusión con una citocina) y las inmunocitocinas en las que IL2 está fusionada a las cadenas H (fusión a través de H con un 14.18 humanizado y fusión a través de H con un 14.18 quimérico). Esta diferencia notable entre las construcciones de fusión a través de la cadena H y L es altamente significativa debido a la limitación general de los niveles de dosis de inmunocitocinas de IL2 (debido a la toxicidad de IL2), de manera que los niveles suficientes para desencadenar este mecanismo efector *in vivo* pueden ser bastante limitados o requerir dosis asociadas a efectos secundarios indeseados.

Ejemplo 6: Actividad de citocina de una inmunocitocina que tiene una citocina fusionada a la región constante de cadena ligera:

Las siguientes moléculas se evaluaron para determinar su actividad de IL2: IL2 recombinante, originalmente de Chiron (ahora comercializada por Prometheus Therapeutics and Diagnostics), IL2 recombinante de Hoffman-La Roche, fusión a través de cadena pesada con ch14.18-IL2-H (fusión a través de H con un 14.18 quimérico) y fusión a través de cadena ligera con ch14.18-IL2-L (fusión a través de L) que contenía la SEQ ID NO: 1.

La bioactividad de IL2 se lleva a cabo en placas de 96 pocillos que contienen linfocitos T de ratón CTLL-2 que se han privado de IL2 durante 48 horas antes del ensayo. Estas células responden a IL2 a través de la unión al receptor de IL2 con alta afinidad. Las diluciones de las proteínas purificadas y los medios de cultivo que contienen inmunocitocinas se colocan en placas y después se mezclan con células CTLL-2 en medio de cultivo y se incuban durante dos días a 37 °C. Se agrega medio adicional que contiene ³H-timidina y se continúa con la incubación

durante 16 horas adicionales. La incorporación de ^3H se mide mediante el uso de protocolos estándares. La medida en que la IL2 fusionada induce la proliferación a través del receptor de IL2 de ratón se evalúa en función de la cantidad de incorporación de ^3H .

5 Los resultados se muestran en la Figura 8. La IL2 fusionada al extremo C de la región constante de cadena ligera es al menos tan activa como la IL2 recombinante (no fusionada a una citocina) y la IL2 fusionada a la cadena pesada en ch14.18-IL2-H en el ensayo de bioactividad de IL2. Esto muestra que la fusión al extremo C de la región constante de cadena ligera no tiene ningún efecto significativo sobre la función de IL2 y su interacción con el receptor de IL2 con alta afinidad. Se esperan resultados similares con otras citocinas, incluidas, por ejemplo, citocinas similares que tienen aproximadamente la misma distancia entre la intersección con el extremo C de la cadena ligera y el primer punto de contacto con el receptor fundamental.

Se debe apreciar que también se pueden desarrollar citocinas mutantes con actividad potenciada, reducida o específica para receptor y evaluarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria.

15 Se pueden evaluar las propiedades funcionales de citocinas mediante el uso de cualquier ensayo adecuado. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de proliferación de linfocitos T. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de aproximadamente 100 mL de sangre humana normal (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, Calif.) diluida 1:2 en disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco fría (libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; DPBS, por sus siglas en inglés). Se coloca Ficoll-Paque (Pharmacia) como base y la muestra se centrifuga para aislar las PBMC con lavados extensivos posteriores en DPBS fría. Se generan blastos PHA (linfocitos T activados) al resuspender células en RPMI 1640 que contiene suero fetal bovino al 10 % (Hyclone), al cual se agregan cada uno de los siguientes al 1 % (p/v): L-glutamina; aminoácidos no esenciales; piruvato de sodio; y antibiótico-antimicótico (medios RPMI) a una densidad de 10^6 células/ml. Se agrega fitohemaglutinina (PHA-P; Sigma) a una concentración final de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ y las células se incuban a 37 C. , CO_2 al 5 % durante 3 días. Las células se cosechan y lavan dos veces en DPBS, se resuspenden en medios RPMI y se colocan en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 10^5 células/pocillo en $200 \mu\text{l}$ con concentraciones variables de IL2 o inmunocitocina variante en medios RPMI. Las placas se incuban durante 48 horas a 37 C. , se someten a impulsos con $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -timidina (DuPont NEN.RTM., Boston, Mass.)/pocillo durante 6 horas, se cosechan y se midió la radioactividad después de cosechar las células en filtros de fibra de vidrio.

30 En algunas realizaciones, se puede usar un ensayo de proliferación de linfocitos citolíticos naturales. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de aproximadamente 100 mL de sangre humana normal (Irwin Memorial Blood Bank, San Francisco, Calif.) diluida 1:2 en disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco fría (libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; DPBS, por sus siglas en inglés). Se coloca Ficoll-Paque (Pharmacia) como base y la muestra se centrifuga para aislar las PBMC con lavados extensivos posteriores en DPBS fría. Los linfocitos citolíticos naturales se separan de otras células. Se puede usar el kit de aislamiento de linfocitos citolíticos naturales de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania; núm. de cat. 465-01) con este fin. El kit consiste en dos reactivos, columnas de separación y un soporte de columna magnético muy potente. El primer reactivo es un cóctel de anticuerpos CD3, CD4, CD19, CD33 monoclonales conjugados con hapteno de isotipo de IgG1 de ratón. Esto es para consumir las PMBC de linfocitos T, linfocitos B y células mieloides. Se contempla que se puede usar cualquier conjunto adecuado de anticuerpos que reconocen estos tipos de células. El segundo reactivo consiste en microperlas MAC coloidales superparamagnéticas conjugadas con un anticuerpo anti-hapteno. Las células se resuspenden en PBS con seroalbúmina bovina al 0,5 % y 2 mM de EDTA (PBS/EDTA). El volumen de la suspensión depende de la cantidad de células usada y Miltenyi Biotec lo proporciona en un cuadro. Típicamente, con una cantidad de células de 2 a $5 \cdot 10^8$ PBMC, las células se resuspenden en $800 \mu\text{L}$ de tampón y después se usan $200 \mu\text{L}$ de cada reactivo. Después de la incubación con los reactivos, se agregan las células a la columna (resuspendidas en 2 ml de tampón). Las células que no son linfocitos citolíticos naturales se adhieren al imán (se consumen) y los linfocitos citolíticos naturales se aíslan y recogen en el flujo de paso. Las células se lavan, se resuspenden en medios RPMI (que contienen: RPMI 1640, al cual se agregan cada uno de los siguientes al 1 %: L-glutamina; aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio; antibiótico-antimicótico (todos de Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.); suero fetal bovino al 10 % (Hyclone)), y se colocan en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 10^5 células/pocillo en $200 \mu\text{l}$. Las células se cosechan y lavan dos veces en DPBS, se resuspenden en medios RPMI y se colocan en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 10^5 células/pocillo en $200 \mu\text{l}$ con concentraciones variables de IL2 o inmunocitocina variante en medios RPMI. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 C. , se sometieron a impulsos con $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -timidina (DuPont NEN.RTM., Boston, Mass.)/pocillo durante 6 horas, se cosecharon y se mide la radioactividad después de cosechar las células en filtros de fibra de vidrio.

55 Ejemplo 7: PK de una inmunocitocina que tiene una citocina fusionada a la región constante de cadena ligera:

La Figura 9 muestra que una fusión a través de L a IL2 con un 14.18 quimérico tiene un perfil farmacocinético más favorable que una fusión a través de H a IL2 optimizada con un 14.18 quimérico. Esta versión tiene una modificación de enlazador que aumenta la semivida de inmunocitocinas en las que IL2 está fusionada a la cadena H.

60 En algunas realizaciones, la farmacocinética de proteínas de fusión de IL2 se puede someter a ensayo en ratones como se indica a continuación. Por ejemplo, se usan tres ratones de 6 a 8 semanas. Se inyectan $25 \mu\text{g}$ de las

proteínas de fusión, diluidos hasta 125 µg/ml en PBS, en la vena de la cola de los ratones y se obtienen muestras de sangre de 50 µl mediante sangrado retroorbital inmediatamente después de la inyección (0 horas) y después de 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas de la inyección. Las muestras de sangre se recogen en tubos recubiertos con heparina para evitar la coagulación de la sangre y se miden los niveles de inmunocitocina en el sobrenadante plasmático postcelular en un ensayo ELISA. El procedimiento del ensayo ELISA usado para los estudios farmacocinéticos se ha descrito anteriormente (WO01/58957). La captura de una inmunocitocina a partir de plasma se puede llevar a cabo sobre recubrimiento con antígeno (p. ej., placas recubiertas con GD2 o EpCAM) y la detección se puede llevar a cabo con un anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra IL2. En otras realizaciones, el reactivo de captura es antisueros anti-IgG humana de cabra policlonales y la detección es un conjugado anti-IL2 humana de ratón biotinilado que se cuantifica posteriormente mediante el uso de un conjugado de estreptavidina-HRP.

En algunas realizaciones, la farmacocinética de proteínas de fusión de IL2 se puede someter a ensayo en ratones como se indica a continuación. Se inyectan aproximadamente 10 µg de una molécula de inmunocitocina 14.18- IL2 en la vena de la cola de los ratones y se toman muestras inmediatamente después mediante sangrado retroorbital para establecer el punto t₀. Se toman muestras adicionales después de 15, 30, 60 min, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. Se prepara suero a partir de muestras de sangre mediante protocolos estándares y se almacena en frío hasta el ensayo. Se modifica un ELISA específico para medir la inmunocitocina intacta a partir de un protocolo existente (Gan J, et al., Specific enzyme-linked immunosorbent assays for quantitation of antibody-cytokine fusion proteins. Clin Diagn Lab Immunol. 6(2):23642, 1999) y se basa en la captura en una placa de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo antiidiotípico (1A7) específico para el anticuerpo 14.18 con la posterior detección de cualquier proteína capturada con antisueros específicos anti-IL2.

Ejemplo 8: Biodisponibilidad subcutánea de una inmunocitocina que tiene una citocina fusionada a la región constante de cadena ligera:

La Figura 10 muestra que la fusión a través de la cadena ligera (L) a ch14.18-IL2 tiene una biodisponibilidad subcutánea más alta que la fusión a través de la cadena pesada (H) a ch14.18-IL2. Esto puede deberse a la captación y degradación intracelular reducida por medio de células que llevan FcR en el compartimiento linfático. Se sabe que las proteínas inyectadas subcutáneamente son recogidas por el sistema linfático y después emergen lentamente en el torrente circulatorio como una función de si son recogidas o no por células en dicho compartimiento. Degradación reducida por células que llevan FcR en el compartimiento linfático y, por lo tanto, liberación aumentada y/o extendida en el torrente circulatorio.

Ejemplo de referencia 9: Inmunocitocinas que contienen otras citocinas que tienen estructuras similares:

Se pueden generar inmunocitocinas que contienen otras citocinas fusionadas a los extremo C de la cadena ligera. Por ejemplo, se puede usar una proteína de fusión de IL-7, IL-15, IL-15-IL15R α , IL-21, IFN α , GM-CSF y otras citocinas.

Estas inmunocitocinas se pueden generar y evaluar mediante el uso de métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden evaluar sus propiedades estructurales y funcionales mediante el uso de ensayos y testigos descritos en la presente memoria. Además, los ensayos para evaluar la actividad de otras citocinas son conocidos para el experto en la técnica y se pueden usar para evaluar la actividad de la citocina en una inmunocitocina que tiene la citocina fusionada al extremo C de la región constante de cadena ligera. En algunos casos, dependiendo de la citocina específica, puede ser necesario agregar un péptido enlazador o acortar la longitud de la intersección para un ensamblaje de la inmunocitocina y una bioactividad de la citocina óptimos y evaluar variantes de dichos enlazadores mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria.

Ejemplo 10: Inmunocitocinas específicas diana que contienen citocinas blindadas que están enmascaradas y se exponen y activan después de la unión al antígeno diana:

La Figura 3 ilustra cómo se puede blindar o enmascarar una citocina (o residuos activos dentro de una citocina) mediante la conformación de una inmunocitocina en ausencia de unión a una célula diana que expresa antígeno según se describe en más detalle en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se pueden diseñar fusiones de inmunocitocina a través de cadena ligera para enmascarar o blindar (al menos parcialmente) la citocina y reducir, de este modo, su actividad, en ausencia de unión a una célula que expresa un antígeno diana. A diferencia del extremo C de la cadena H de IgG, el extremo C de la cadena L está restringido por la unión disulfuro formada entre el residuo Cys del extremo y el Cys en la cadena H (p. ej., en proteínas de fusión de inmunocitocina a través de cadena ligera basadas en IgG1 e IgG3). Por consiguiente, cuando un polipéptido tal como una citocina se fusiona a este extremo C y se ensambla en una inmunocitocina intacta, se espera que la porción del extremo N de la citocina esté restringida también. Esta propiedad se puede usar para reducir la actividad biológica del polipéptido (p. ej., citocina) en la configuración no unida de la proteína de fusión de anticuerpo o para conferir especificidad para receptor.

En algunas realizaciones, se diseña una inmunocitocina para reducir la longitud y/o flexibilidad de la intersección del extremo C de la cadena ligera y el extremo N de la citocina. Por ejemplo, se pueden retirar uno o más aminoácidos del extremo N de la citocina.

5 Se debe apreciar que, en algunas realizaciones, las eliminaciones se hacen en una región del extremo N flexible, o porción de esta, que no se necesita para la función de la citocina. Por ejemplo, una IL2 u otra citocina puede tener 1-10, 1-5, 4, 3 o 2 aminoácidos del extremo N eliminados. En algunas realizaciones, después de la unión a una célula diana que expresa un antígeno de interés, el cambio de conformación del anticuerpo expone un residuo de contacto, p. ej., el Asp20 de IL2 y activa, de este modo, la porción de citocina (p. ej., IL2) de la inmunocitocina.

Dos ejemplos de proteínas de fusión que se diseñaron para demostrar este efecto tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

SEQ ID NO: 5

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI
 HKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLE
 LKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptstqlql
 ehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettf
 mceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 6

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSN
 RFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
 TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECtqlqlchllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkat
 10 elkhqlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

La SEQ ID NO: 5 tiene los residuos 5-9 de IL2 eliminados (pero mantiene la secuencia APTS altamente conservada del extremo N preservada), mientras que la SEQ ID NO: 6 tiene los residuos 1-9 de IL2 eliminados y, por lo tanto, acerca la primera hélice alfa a la unión disulfuro entre las cadenas H y L e involucra a la Cys del extremo C de la cadena L.

15 Se pueden usar consideraciones de diseño similares para otras citocinas, por ejemplo, citocinas que tienen un residuo Asp importante u otro aminoácido importante dentro de aproximadamente los 20-30 aminoácidos desde el extremo N (p. ej., IL-7, IL-15, IL-21, IFN α).

20 Se debe apreciar que se pueden usar consideraciones de diseño similares para otras proteínas de fusión de anticuerpo donde una proteína distinta de una citocina se fusiona al extremo C de la cadena ligera. En algunas realizaciones, las proteínas que tienen un residuo activo importante en el extremo N o cerca de este pueden tener su actividad blindada mediante la fusión al extremo C de la cadena ligera. Sin embargo, se debe apreciar que, dependiendo de la distancia relativa entre el residuo activo y la intersección de fusión, puede ser necesario ajustar la longitud de la proteína (p. ej., mediante la eliminación de uno o varios aminoácidos del extremo N no esenciales o mediante la adición de uno o varios aminoácidos enlazadores, para obtener una relación deseada de actividad entre la fusión de anticuerpo unida a la célula diana y no unida.

25 Los ejemplos de relaciones de actividad entre la fusión de anticuerpo unida a la célula diana y no unida incluyen 1:2; 1:5; 1:10; 1:50; 1:100; 1:1000; y relaciones más bajas, más altas o intermedias.

Se pueden usar ensayos de unión *in vitro* y/o celulares para evaluar la medida en que la unión al antígeno diana (p. ej., a antígenos en una célula diana) activa una citocina fusionada a la cadena ligera de una inmunocitocina.

30 En algunas realizaciones, se puede usar un anticuerpo antiidiotípico en disolución para exponer y/o activar un péptido de fusión enmascarado (p. ej., una citocina). Por ejemplo, se puede mezclar una inmunocitocina en disolución con un anticuerpo antiidiotípico y agregarla en diferentes diluciones a una preparación de células que responden para determinar el perfil de actividad de la inmunocitocina.

35 En algunas realizaciones, se puede acoplar un anticuerpo antiidiotípico a un soporte sólido tal como una perla o una placa, bloquearlo y ponerlo en contacto con cantidades diferentes de inmunocitocina y exponerlo a una cantidad fija de células que responden. Alternativamente, la inmunocitocina se puede unir a células tumorales que expresan antígeno que posteriormente se irradian (para evitar la proliferación) y se exponen a células que responden. Ver, por ejemplo, Hank et al., Clin. Cancer Res., 1996, tomo 2, págs. 1951-1959. Se debe apreciar que la actividad de la unión con respecto a la no unión (p. ej., en función de un ensayo de no unión estándar) se puede calcular para
 40 determinar si la unión aumenta la actividad de la citocina fusionada.

Ejemplo 11: Ensayos para identificar inmunocitocina que tienen especificidad de citocina alterada:

En algunas realizaciones, las inmunocitocinas descritas en la presente memoria pueden tener especificidad alterada (p. ej., diferentes efectos relativos sobre la producción y/o activación de linfocitos citotóxicos naturales y/o la producción y/o activación de linfocitos T citotóxicos) con respecto a citocinas no fusionadas. Los ensayos para evaluar las especificidades de citocina se conocen en la técnica. Una línea celular útil que expresa el receptor de IL2 con afinidad intermedia, pero no el de alta, se denomina TF-1 β y depende de IL2 u otras citocinas exógenas para el crecimiento y la supervivencia. La proliferación de esta línea celular también se puede medir usando tintes no radioactivos convenientes tales como Alamar Blue y Presto Blue, y otros. Las células TF-1 β se mantuvieron en medio RPMI que contenía suero de ternero fetal al 10 % y rIL2 (50 UI/ml). El día del ensayo, las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en RPMI sin IL2. Las proteínas de prueba se diluyeron en RPMI sin IL2 y se colocaron en pocillos en serie de una placa de 96 pocillos por duplicado. La suspensión de células TF-1 β (100 ul a 10⁵ células/ml) se agregó a todos los pocillos y la placa se incubó a 37 °C durante 48 horas, a continuación, se agregó Presto Blue (20 ul/pocillo - InVitrogen) a todos los pocillos. Después de una incubación de 1 hora a 37 °C, se midió la fluorescencia generada por la reducción mitocondrial mediante el uso de un lector de placa fluorescente Tecan GENios Pro (535 nm de excitación y 590 nm de emisión). El mismo exacto ensayo se lleva a cabo usando la línea celular CTLL-2 de ratón para determinar la actividad mediada a través del receptor de IL2 con alta afinidad y una comparación de los resultados define el grado de selectividad del receptor. Esta estrategia se usó para evaluar la posible selectividad por receptor de inmunocitocinas de ch14.18-L-IL2 con varias secuencias variantes y se comparó con la proteína de fusión a través de la cadena H (ch14.18-H-IL2). Se sabe que la última molécula mencionada no tiene selectividad por receptor en comparación con rIL2 libre.

Mediante el uso de estas dos líneas celulares como indicadores de la especificidad por receptor, se evaluaron varias construcciones para determinar la bioactividad en el bioensayo no radioactivo y se usaron las concentraciones necesarias para inducir la mitad de la proliferación máxima para determinar la DE50. Estas moléculas se produjeron mediante la transfección transitoria de células HEK 293 ya sea en suspensión, o en placas de cultivo tisular, y todas se purificaron mediante unión y elución a partir de proteína A Sepharose. Algunas de estas moléculas también se produjeron y purificaron a partir de células de mieloma NS/0 transfectadas de manera estable. Después de una purificación de una etapa a partir del medio de cultivo celular, las moléculas se analizaron mediante SDS-PAGE y se halló que estaban completamente ensambladas y estabilizadas con las uniones disulfuro adecuadas (Figura 11). Las proteínas individuales exhibieron bioactividad idéntica ya sea si se produjeron en células NS/0 de ratón o HEK293 humanas. Debido a la variabilidad de estos ensayos basados en células, se repitieron múltiples veces.

Inmunocitocina	DE ₅₀ de CTLL-2 (af. alta) (ng/ml)	DE ₅₀ de TF-1 β (af. int.) (ng/ml)	Actividad relativa Af. alta/Af. inter.	Selectividad para el receptor de afinidad alta
H-IL2	0,9-2,0	7,0-9,0	1,0/1,0	1
L-IL2 SEQ ID NO: 1	1,0-2,0	65-66	1,0/0,12	8,3
L-IL2 SEQ ID NO: 3	1,5	10	1,0/0,8	1,25
L-IL2 SEQ ID NO: 5	0,8-2,0	>500	1,0/0,01	>100
L-IL2 SEQ ID NO: 6	0,7-2,0	>500	1,0/0,01	>100
L-IL2 SEQ ID NO: 10	1,0-2,0	>500	1,0/0,01	>100

La Tabla 1 muestra la potencia de cada construcción para cada línea celular, y se muestra la potencia relativa en función del tipo de receptor.

-----Cys-X₁₉-D₂₀-----Q₁₂₆----- SEQ ID NO: 1
 -----Cys-QRVD-X₁₉-D₂₀-----Q₁₂₆----- SEQ ID NO: 3

-----Cys-X ₁₉ -D ₂₀ -----	-----W ₁₂₆ -----	SEQ ID NO: 10
-----Cys-X ₁₄ -D ₂₀ -----	-----Q ₁₂₆ -----	SEQ ID NO: 5
-----Cys-X ₁₀ -D ₂₀ -----	-----Q ₁₂₆ -----	SEQ ID NO: 6

La Tabla 2 ilustra las secuencias de las construcciones que se usaron.

De manera sorprendente, la construcción que contenía la SEQ ID NO: 1 mostró que tenía una actividad significativamente reducida mediante el uso de la línea celular TF-1 β (receptor intermediado), mientras que mantuvo la actividad normal en la línea CTLL-2 (como se demuestra en el ensayo de captación de timidina radioactiva). Esta especificidad aproximada de 8 veces fue altamente reproducible en varios ensayos individuales y sugiere que esta molécula podría tener efectos secundarios significativamente reducidos en comparación con una molécula similar con actividad completa contra el receptor intermedio. En cambio, una construcción que contenía la SEQ ID NO: 3 (con un espaciador de 4 residuos entre la Cys del extremo C y el primer residuo de IL2) tuvo actividad completa contra el receptor intermedio. Esto sugiere intensamente que la distancia entre la intersección del residuo Cys y el residuo de contacto de cadena beta, D20, determina la actividad contra el receptor intermedio como una función de su capacidad de acceso al receptor de IL2. Se debe apreciar que se pueden usar otras secuencias espaciadoras. La dependencia de la distancia se demuestra adicionalmente mediante el uso de construcciones con distancias más cortas entre la Cys del extremo C y D20. Las construcciones que contenían la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6 (con eliminaciones del residuo 5 y 9, respectivamente, y diseñadas originalmente para ser inactivas antes de la unión al antígeno) no exhibieron actividad detectable mediante el uso de la línea celular TF-1 β hasta las concentraciones más altas evaluadas. Se evaluó también otra estrategia con respecto a obtener mayor especificidad para el receptor de IL2 de afinidad alta con respecto al con intermedia. En este caso, se combinó una mutación en un residuo conocida por hacer contacto con la cadena gamma del receptor de IL2 (Q126W) con la construcción que contenía la SEQ ID NO: 1 para crear la SEQ ID NO: 10. Esto combina dos reducciones relativamente modestas en el receptor intermedio que se une a las dos cadenas de este complejo (beta y gamma), pero la consecuencia fue una reducción notable en la actividad. A pesar de este efecto notable del receptor intermedio, no hubo ninguna reducción en la actividad contra el receptor de afinidad alta con esta construcción ni ninguna de las otras construcciones indicadas en la Tabla 1.

Ejemplo 12: Ensayos para identificar inmunocitocinas que tienen niveles intermedios de actividad de citocina:

Se pueden construir variantes de inmunocitocina al fusionar una cadena ligera de anticuerpo a variantes de citocina que tienen diferentes longitudes de eliminaciones en el extremo N, según se describió anteriormente. Las variantes que se identifican con niveles intermedios de actividad de citocina (p. ej., entre actividad completa y ninguna actividad) pueden tener actividad enmascarada debido a la conformación de la inmunocitocina. En algunas realizaciones, la actividad de citocina puede aumentar después de la unión al antígeno, según se ilustra en la Figura 3. Por consiguiente, las variantes de inmunocitocina que tienen niveles intermedios de actividad (p. ej., entre 1 % y 99 %, entre 10 % y 90 %, entre 20 % y 80 %, entre 30 % y 70 %, aproximadamente 50 %, de actividad completa, u otro nivel de actividad reducida) pueden ser candidatas para evaluación en ensayos descritos anteriormente para determine si la actividad de la citocina aumenta después de la unión al antígeno (p. ej., después de unirse a una célula diana que expresa el antígeno diana).

En algunas realizaciones, se pueden identificar variantes de fusión con niveles intermedios de actividad de citocina mediante el uso de uno o más ensayos basados en células.

Por ejemplo, las variantes de eliminación en el extremo N de IL2 fusionada a la cadena ligera de un anticuerpo y que tienen mutaciones en residuos de contacto clave con el receptor de afinidad alta (p. ej., R38 y F42 se pueden evaluar en ensayos de bioactividad de IL2. El grado de bioactividad de citocina general o actividad de receptor específica se puede modificar mediante el efecto combinatorio de estas interacciones de receptor individuales, una basada en la distancia entre el residuo Cys del extremo C de cadena ligera y el punto de contacto D20 y la segunda basada en el otro residuo de contacto. En la mayoría de los casos, las sustituciones de aminoácidos con solo un efecto modesto por sí solas podrían ser suficientes para tener efectos potentes en combinación.

Ejemplo 13: Análisis de la actividad de IL2 y especificidad para receptor de inmunocitocinas con la citocina fusionada al extremo C de la cadena ligera después de unirse a perlas recubiertas con antígeno.

Para estimular el microentorno de la célula diana en el cual una inmunocitocina se une a una superficie celular, se acoplaron perlas magnéticas con un anticuerpo antiidiotípico, 1A7, que reconoce el idiotipo del anticuerpo anti-GD2 14.18 y, de este modo, imita al antígeno GD2. Se usó un kit Dynabead Antibody Coupling Kit (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega) para acoplar 100 μ g de 1A7 con aproximadamente 10 mg de perlas secas según las instrucciones del fabricante. La preparación final contenía 1 mg de perlas acopladas por ml de suspensión con la cantidad esperada de 50 ng de anticuerpo por microlitro de suspensión de perlas. Las mezclas de inmunocitocina contenían 200 ng de cada proteína, 8 microlitros de perlas (400 ng de anticuerpo antiidiotípico en un volumen final de 200 microlitros que contenían medio RPMI con suero fetal bovino al 10 %, pero nada de IL2 (medio de crecimiento). Las

mezclas se incubaron en diferentes condiciones, pero todas proporcionaron resultados similares. Estas incluyen temperatura ambiente durante 2 horas en tubos Eppendorf estériles en una rueda rotativa; 1 hora a 37 °C en pocillos de una placa de 96 pocillos; y 1 hora a 37 grados en un criovial plástico de fondo unido con mezcla ocasional. Después de la incubación, las perlas se recuperaron con un imán y se lavaron en 0,5 ml de medio de crecimiento y se resuspendieron en el mismo. Se usó una inmunocitocina testigo con actividad de IL2 completa contra ambos tipos de receptores, pero sin capacidad para unirse al anticuerpo antiidiotípico 1A7, para demostrar que la bioactividad es dependiente de la unión al antígeno. Los complejos de perla-inmunocitocina se mezclaron suavemente y cada uno se agregó por duplicado a pocillos de una placa de 96 pocillos, a continuación, se hicieron diluciones dobles al transferir volúmenes de 100 microlitros por una serie de pocillos que contenían 100 microlitros de medio de crecimiento. Se agregó una suspensión de células que responden que contenía 10⁵ células/ml a todos los pocillos (100 microlitros/pocillo) y las placas se incubaron durante 2-3 días a 37 °C. El crecimiento celular se midió mediante el uso del reactivo Presto Blue Cell Viability Reagent (Invitrogen), según se describió anteriormente. Este método se usó para comparar la actividad de inmunocitocinas unidas construidas como una fusión a través de cadena pesada (14.18-IL2-H) o una fusión a través de cadena ligera (14.18-IL2-L). La molécula mencionada por último contenía la SEQ ID NO: 1, que exhibió una selectividad de unión al receptor de afinidad alta de aproximadamente 8 veces (debido a la pérdida de la actividad contra la forma intermedia) cuando se evaluó como una proteína soluble. En la forma unida, hubo apenas una ligera pérdida de actividad mediante el uso de células TF-1 β , donde difirió con respecto a la molécula 14.18-IL2-H menos de dos veces en múltiples experimentos.

Se llevaron a cabo ensayos adicionales del mismo modo usando las diversas inmunocitocinas. En dos de dichos experimentos, las suspensiones de perlas unidas a inmunocitocinas (0,5 ml) se agregaron a placas con células TF-1 β (0,2 ml x 2) y el 0,1 ml restante de las suspensiones se diluyó 5 veces y se agregó a una segunda placa de 96 pocillos a la cual se agregaron células CTLL-2. El primer experimento comparó moléculas 14.18-IL2-L que contenían la SEQ ID NO: 3 (completamente activa para ambos receptores en disolución) o la SEQ ID NO: 10 (completamente activa para el receptor de afinidad alta e inactiva para el receptor intermedio). Se incluyó una inmunocitocina completamente activa que no se une al anticuerpo antiidiotípico 1A7 en las perlas para evaluar si las inmunocitocinas no unidas eran responsables de la actividad de proliferación resultante. Como se muestran en la Figura 12A, la inmunocitocina de no unión no tuvo actividad en el ensayo con TF-1 β ni CTLL-2, lo que demuestra que solo las inmunocitocinas unidas proporcionan señales proliferativas. Cuando las dos inmunocitocinas 14.18-IL2-L se unieron a perlas la que tenía la SEQ ID NO: 3 fue muy activa con ambas líneas de células, mientras la que tenía la SEQ ID NO: 10 fue solo activa en inducir la proliferación de CTLL-2, lo que refleja estrechamente lo que se observó en sus formas solubles. Un segundo experimento (Figura 12B) comparó las actividades de las moléculas 14.18-IL2-L que diferían en las distancias entre su intersección de fusión (la Cys del extremo C de la cadena L) y el residuo D20 de IL2. La molécula con la distancia más larga (SEQ ID NO: 3) tuvo la actividad más alta contra el receptor intermedio (células TF-1 β) en disolución (8 veces más alta que la que tenía la SEQ ID NO: 1), pero fue solo ligeramente más alta cuando se unió a las perlas. Esto es similar a lo observado con la molécula 14.18-IL2-H descrita anteriormente. Las moléculas con eliminaciones de los residuos 5 o 9 en el extremo N de IL2 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) tuvieron escasa o ninguna actividad en las formas soluble o unida, lo cual sugiere que esta distancia es demasiado corta para permitir el acceso del receptor al punto de contacto D20, incluso cuando se une al antígeno. Cuando las mismas mezclas de perla se evaluaron con células CTLL-2, todas exhibieron actividad que fue cercana o mucho más potente que la molécula con actividad y especificidad normales en disolución (SEQ ID NO: 3). La molécula con la distancia más corta (SEQ ID NO: 6) tuvo la actividad más baja, pero todavía significativa, mientras que las moléculas que eran 4 (SEQ ID NO: 1) o 9 (SEQ ID NO: 5) residuos más cortas fueron significativamente más activas contra el receptor de IL2 de afinidad alta cuando se presentaron en forma unida.

Estos resultados demuestran que esta estrategia de fusión posibilita un modo único de modular la bioactividad de una manera que no requiere mutaciones proteicas o se puede combinar con mutagénesis para crear moléculas adicionales con propiedades únicas. Aunque solo la molécula con la SEQ ID NO: 3 exhibió una diferencia en la bioactividad contra el receptor de IL2 intermedio como consecuencia de la unión al antígeno, moléculas adicionales con distancias ligeramente más cortas entre la intersección de fusión y D20 podrían exhibir diferencias más notables que las observadas con esta molécula. Alternativamente, moléculas con una distancia ligeramente más larga (p. ej., más uno o dos o más residuos) y una mutación puntual en un residuo de contacto con el receptor tal como Q126, N88, R38 o F42 pueden exhibir diferencias de actividad entre las formas soluble y unida e identificar, de este modo, fusiones candidatas que tienen mayor actividad después de la unión al antígeno (p. ej., unión al antígeno de superficie celular).

Ejemplo de referencia 14: Construcción de un anticuerpo biespecífico en el que un scFv que reconoce un antígeno de superficie celular se fusiona al extremo C de la cadena ligera

Los anticuerpos anti-CD3 son capaces de desencadenar la proliferación de linfocitos T humanos, especialmente en combinación con una segunda señal tal como unión a anti-CD28 o IL2 exógena. Son capaces, además, de desencadenar la lisis de células diana cuando se usan como parte de un anticuerpo biespecífico, junto con un anticuerpo que reconoce una molécula en la superficie celular diana. La mayoría de los anticuerpos biespecíficos son monoespecíficos y están compuestos por fragmentos de anticuerpo que dan como resultado semividas en la circulación cortas. Esto es para evitar la reticulación de los linfocitos T en la circulación con una molécula bivalente, antes de que la molécula se una a la superficie celular. Debido al posible impedimento estérico proporcionado por la fusión a la cadena ligera, y la posible liberación de este bloque después de la unión a la superficie celular, se hizo un

intento de producir una proteína de fusión de anticuerpo entero bivalente. Dicha molécula podría tener una semivida en la circulación extensa y posiblemente no presentarse a los linfocitos T hasta estar unida a la superficie celular diana. Se sintetizó una secuencia de fusión que codificaba las regiones variables del anticuerpo anti-CD3, OKT3, para que codificase una proteína de fusión dentro del marco con kappa C humana (SEQ ID NO: 11). El ADN que codificaba esta proteína se insertó en un vector que también codificaba la cadena H de 14.18 y el plásmido se usó para transfectar transitoriamente células HEK 293 con lipofectamina. Después de 72 horas de incubación, la proteína de fusión en el sobrenadante de cultivo se purificó mediante unión y elución a partir de perlas de proteína A Sepharose y se analizó mediante SDS-PAGE desnaturalizante con y sin la adición de agente reductor. A diferencia de las fusiones con IL2 a la cadena ligera, esta construcción no formó una molécula completa que se estabilizó mediante uniones disulfuro entre las dos cadenas H, aunque su unión a la proteína A sugiere que formó un heterodímero no covalente. Para mejorar esta y otras construcciones similares, se puede producir una fusión adicional mediante el uso de varios de los primeros residuos aminoacídicos de IL2 como una secuencia enlazadora, dado que las construcciones que contienen esta secuencia formaron todas moléculas heterodiméricas completas estabilizadas con enlaces disulfuro. Se proporciona un ejemplo como la SEQ ID NO: 12 que contiene los primeros siete residuos aminoacídicos de IL2 entre la Cys del extremo C de la cadena L y el primer residuo del scFv. La cantidad de estos residuos necesaria para formar una estructura estable la puede evaluar fácilmente un experto en la técnica. Después de que se identifica una secuencia que posibilita dichas construcciones estables, las moléculas biespecíficas resultantes se pueden evaluar para determinar la unión a linfocitos T que expresan CD3 y el desencadenamiento de una respuesta biológica. La capacidad de desencadenar una respuesta se puede comparar mediante el uso de moléculas en disolución con las que se han inmovilizado en perlas recubiertas con antígeno (o un anticuerpo antiidiotípico sustituto). Si se hace necesario acortar la intersección entre el residuo Cys del extremo C de la cadena L y las regiones de unión a anticuerpo para enmascarar la actividad, esto se puede lograr al retirar residuos sistemáticamente del marco de la región V mientras se deja el enlazador de IL2 optimizado intacto. Las moléculas resultantes se comparan en sus formas soluble e inmovilizada para identificar una que es inactiva en disolución, pero activa después de que se une al antígeno. Por ejemplo, se cultivan PBMC humanas recientemente aisladas con diluciones de las moléculas biespecíficas solubles o unidas a perla, junto con una concentración sinérgica conocida de anticuerpo anti-CD28 en disolución. Después de 48 horas, se usa la incorporación de 3H-timidina para medir la proliferación de linfocitos T, de manera similar a lo que se describió en el ejemplo 6. Cuando se identifica una molécula adecuada, se puede evaluar para determinar su capacidad para inducir la lisis de una célula diana que expresa antígeno mediante el uso de linfocitos T humanos en reposo (las PBMC preparadas recientemente son una fuente) como células efectoras. La lisis se puede evaluar por la liberación de cromo, según se describió anteriormente, para ensayos de ADCC o mediante el uso de tintes no radioactivos (p. ej., Total Cytotoxicity Test, Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN), o liberación de LDH (CytoTox96, Promega).

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos

En algunas realizaciones, una proteína de fusión de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en una de las siguientes secuencias no limitantes. Las secuencias de cadena ligera se muestran en letras mayúsculas (con la región variable en cursiva) y el péptido de fusión se muestra en letras minúsculas. En algunas realizaciones, la secuencia de cadena ligera contiene una región variable de 14.18 de ratón y una región constante de cadena ligera humana. En algunas realizaciones, una cadena ligera se fusiona a la secuencia de IL2 humana. Las variantes de secuencia de aminoácidos de la secuencia de IL2 están subrayadas en letras minúsculas. Un espaciador de 4 aminoácidos está subrayado en letras mayúsculas para las SEQ ID NOs: 3 y 4. Un péptido de 7 aminoácidos correspondiente al extremo N de IL2 está subrayado en letras cursivas minúsculas en la SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 1

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltmrltlfkfympk
 kkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 2

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstktqlqlehlldlqmilnginnyknpklt
 rmltlfkfympkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

45

SEQ ID NO: 3

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQRVDaptssstktqlqlehlldlqmiln
ginnyknpktrmltkfymppkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitf
cqsistlt

SEQ ID NO: 4

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECQRVDaptssstktqlqlehlldlqmiln
ginnyknpktrmltkfymppkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitf
sqsistlt

SEQ ID NO: 5

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptstqlqlehlldlqmilnginnyknpktr
mltkfymppkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsistlt

SEQ ID NO: 6

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECtqlqlehlldlqmilnginnyknpktrmltkfky
mpkkatelkhlqcleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsistlt

5

SEQ ID NO: 7

Región variable de cadena H de 14.18 de ratón:

EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWRQNIKGSLEWIGAIIDPYGG
TSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 8

10 Región variable de cadena L de 14.18 de ratón (esta secuencia representa una región V híbrida que contiene una secuencia de hibridoma de 14.18 original que tiene la primera región de marco cambiada por la de otra región V para obtener buena expresión - ver Gillies et al., J. Immunol Methods, 125:191-202, 1989 - esta secuencia no limitante se usó para las construcciones ejemplificadas en la presente memoria):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELK

15 SEQ ID NO: 9 gb|AAC82527.1| región constante de cadena pesada gamma-1 de inmunoglobulina [Homo sapiens]

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSIGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptssstkkqlqlehlldlqmilnginnyknpkt
rmltkfymppkkelkhlqleelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfewsiiistl

SEQ ID NO: 11

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECqvqlqqsgaelarpgasvkmckasgytfttrytm
hwwkqrpggglewiyinpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhycldywgqgttlvssggggsgg
ggsggggsdiqivltqspaimsaspgkvtmtcsasssvsymnwyqqksqgtsprwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaeda
atyycqqwssnpftfgsgtklein

SEQ ID NO: 12

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECaptsstqvqlqqsgaelarpgasvkmck
asgytfttrytmhwwkqrpggglewiyinpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhycldywgqgttl
vssggggsgggsggggsdiqivltqspaimsaspgkvtmtcsasssvsymnwyqqksqgtsprwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysl

5 tisgmeaedaatyycqqwssnpftfgsgtklein

Equivalentes

10 Se considera que la memoria descriptiva precedente por escrito es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no se debe limitar en alcance a los ejemplos proporcionados, dado que los ejemplos están previstos como una única ilustración. Diversas modificaciones además de las que se muestran y describen en la presente memoria se volverán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de un anticuerpo o una proteína de fusión de un fragmento de unión a antígeno de este, que comprende una proteína de fusión de una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, en donde la proteína de fusión de cadena ligera comprende:
 - 5 una región variable de longitud completa fusionada al extremo N de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y un péptido de fusión fusionado al extremo C de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina sin un péptido enlazador,

en donde el péptido de fusión consiste en una citocina,

en donde la primera cadena pesada comprende una región variable de longitud completa fusionada al extremo N de la región constante de cadena pesada, y

en donde la citocina de dicho péptido de fusión

 - (i) es IL2, o
 - (ii) es IL2 humana, o
 - (iii) es IL2 humana, en donde la longitud de la región en el extremo N de la fusión de citocina se acorta 1 a 10 aminoácidos, o
 - (iv) es una IL2 que tiene una mutación en una o más posiciones correspondientes en la IL2 humana a D20, F42, R38, N88 o Q126.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1.
3. La proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde la región constante de cadena ligera es una región constante C κ o C λ , o en donde la cadena pesada es una cadena pesada de IgG, o en donde la cadena pesada de IgG es una cadena pesada de IgG1, o en donde la cadena pesada de IgG es una cadena pesada de IgG3, o en donde la cadena pesada de IgG es una cadena pesada de IgG2 o IgG4, o en donde la cadena pesada de IgG2 o IgG4 se modifica para incluir una secuencia de IgG1 o IgG3 que confiere función efectora de ADCC y/o CDC, o en donde la secuencia de IgG1 que confiere la función efectora de ADCC y/o CDC es una bisagra de IgG1.
4. La proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde
 - (i) cada uno de los péptidos de anticuerpo y péptidos de fusión son independientemente secuencias de humano, ratón, perro, bovino o gato, o
 - (ii) una o más regiones variables de las primeras cadenas pesada y ligera son secuencias murinas, o
 - (iii) una o más regiones variables de las primeras cadenas pesada y ligera comprenden secuencias humanizadas.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 4, en donde cada uno de los péptidos de anticuerpo y péptidos de fusión son humanos.
6. La proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde las primeras cadenas pesada y ligera se unen específicamente a un antígeno tumoral.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, en donde el antígeno tumoral no es un ácido nucleico, o en donde el antígeno tumoral es una molécula de ADN, o en donde el antígeno tumoral es un antígeno tumoral proteínico, o en donde el antígeno tumoral es un polisacárido, o en donde el antígeno tumoral se selecciona de GD2, CD20, CD19, CSPG (p. ej., CSPG4) y EpCAM.
8. La proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde la inmunoglobulina se une específicamente a una proteína vírica, o en donde las primeras cadenas pesada y ligera se unen específicamente a un antígeno de superficie celular, o en donde el antígeno de superficie celular es un antígeno asociado al cáncer, o en donde el antígeno de superficie celular es una proteína vírica.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 8, en donde las primeras cadenas pesada y ligera se unen específicamente a un antígeno asociado al cáncer.
10. La proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior, en donde se retiran 1 a 5 aminoácidos del extremo amínico de la citocina.
11. Una composición que comprende una proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior.

12. Una composición de la reivindicación 11 que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de cualquier reivindicación anterior, y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
14. Una célula hospedante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
- 5 15. Una célula hospedante de la reivindicación 14, en donde la célula hospedante es una célula bacteriana, de levadura, de insecto, de mamífero, una célula CHO, una célula NSO o una célula HEK293.
16. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición de la reivindicación 11 o 12, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el tratamiento comprende administrar la proteína de fusión a un sujeto que tiene un cáncer, en donde la proteína de fusión se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor.
- 10 17. Una proteína de fusión o una composición para el uso de la reivindicación 16,
- (i) en donde el antígeno asociado al tumor
- (a) se expresa en la superficie extracelular de una célula tumoral del cáncer,
- (b) es un antígeno de matriz extracelular, o
- 15 (c) es un antígeno específico de la vasculatura, o
- (d) es un antígeno específico de macrófago, o
- (ii) en donde la proteína de fusión comprende una citocina que induce linfocitos citolíticos naturales o linfocitos T citotóxicos, o
- (iii) en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, melanoma, osteosarcoma y neuroblastoma.
- 20 18. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición de la reivindicación 11 o 12, para su uso en el tratamiento del cáncer al potenciar la respuesta inmunitaria dirigida a células en un sujeto, en donde la respuesta inmunitaria se potencia al administrar la proteína de fusión a un sujeto, en donde la proteína de fusión se une específicamente a un antígeno que se expresa en la superficie extracelular de una célula en el sujeto.
- 25 19. Una proteína de fusión o una composición para el uso de la reivindicación 18,
- (i) en donde la célula es una célula tumoral y el antígeno es un antígeno tumoral, o
- (ii) en donde la proteína de fusión es para su uso, además, en combinación con un segundo compuesto anticanceroso, opcionalmente en donde el segundo compuesto anticanceroso es un agente quimioterapéutico, o
- (iii) en donde la proteína de fusión es para su uso, además, en combinación con radiación, o
- 30 (iv) en donde la proteína de fusión de anticuerpo o composición se administra subcutáneamente, o
- (v) en donde la proteína de fusión de anticuerpo o composición se administra subcutáneamente a una dosificación menor que 50 mg por metro cuadrado, o
- (vi) en donde la proteína de fusión o composición se administra a una frecuencia de una vez por semana, una vez cada dos semanas o con menor frecuencia.

35

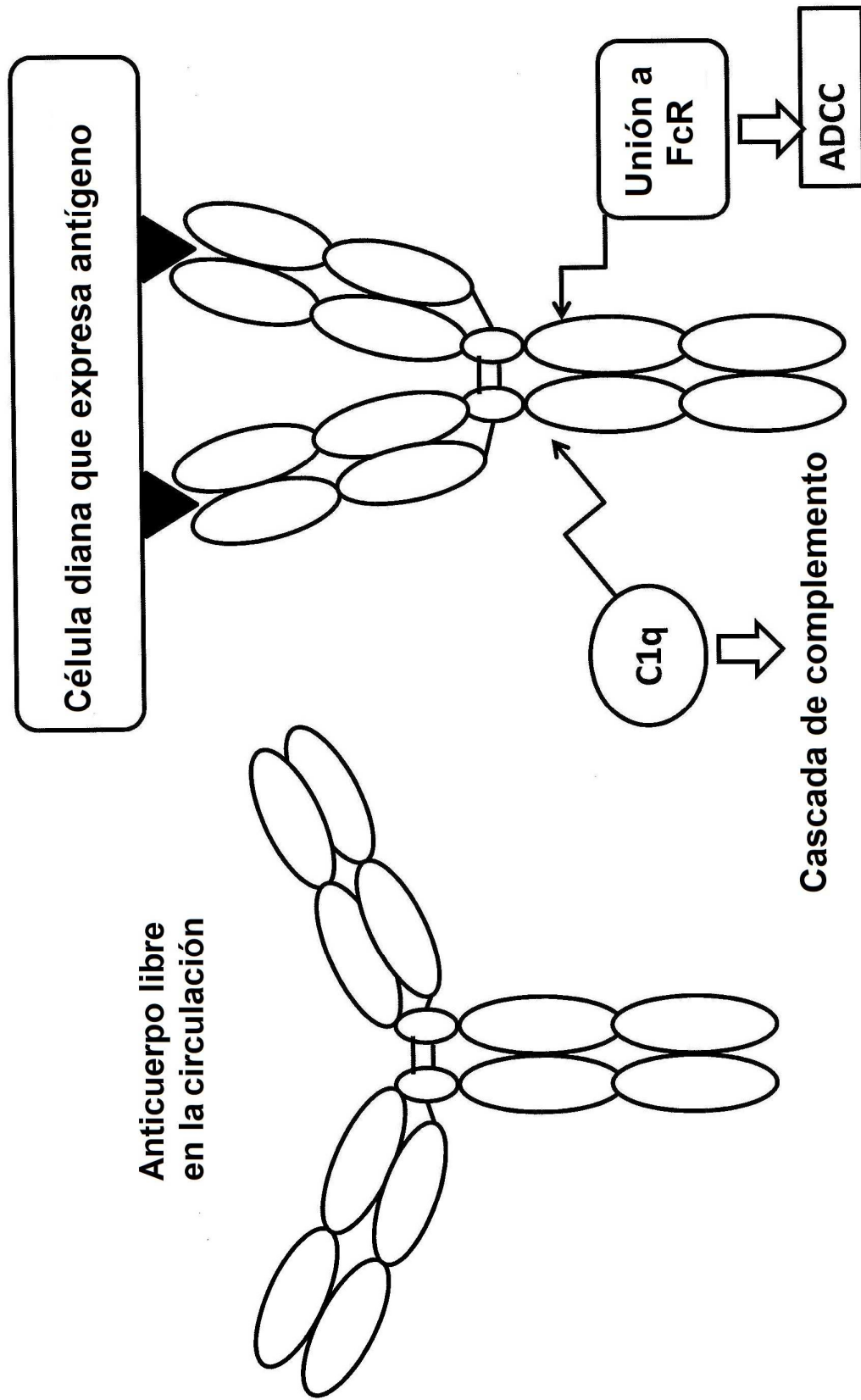


FIG. 1

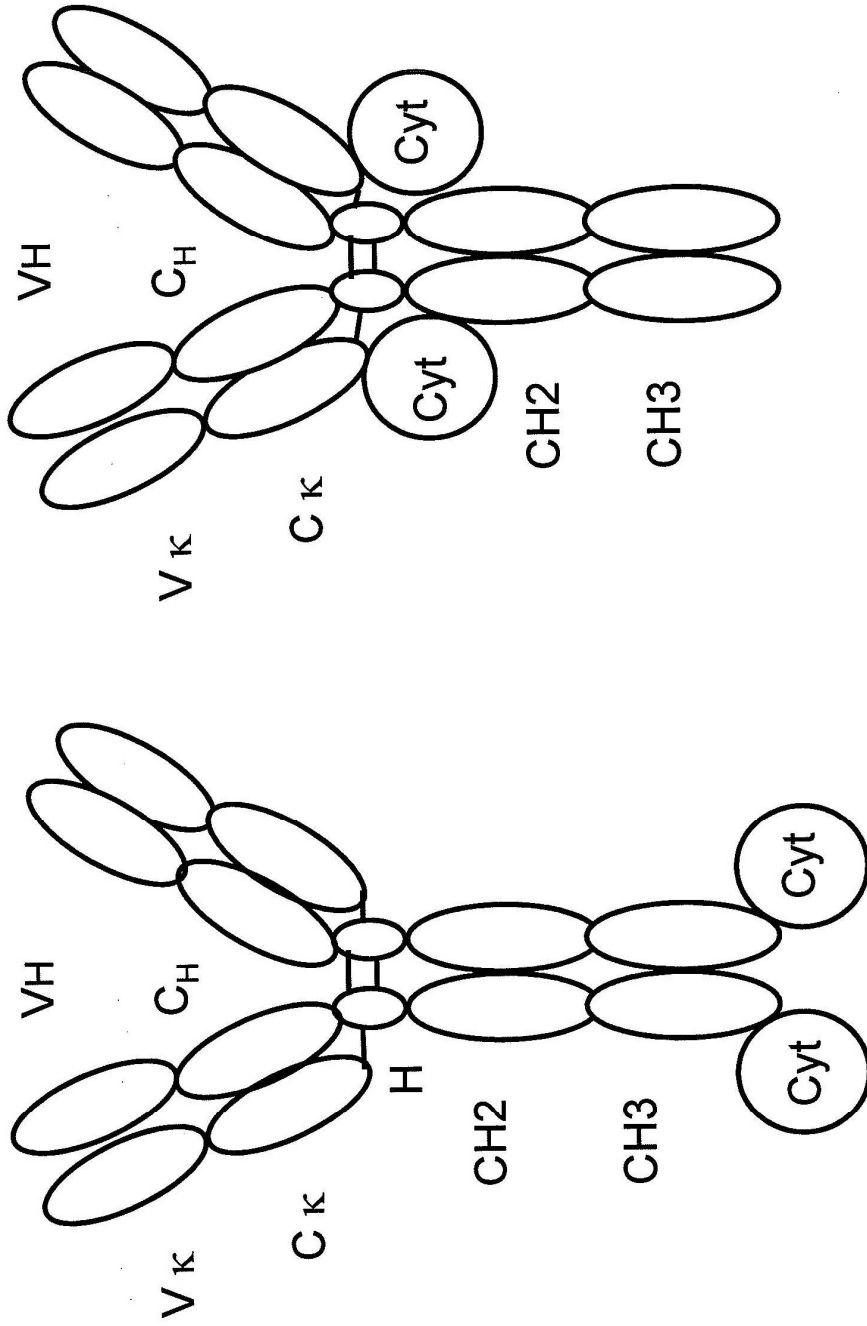


FIG. 2

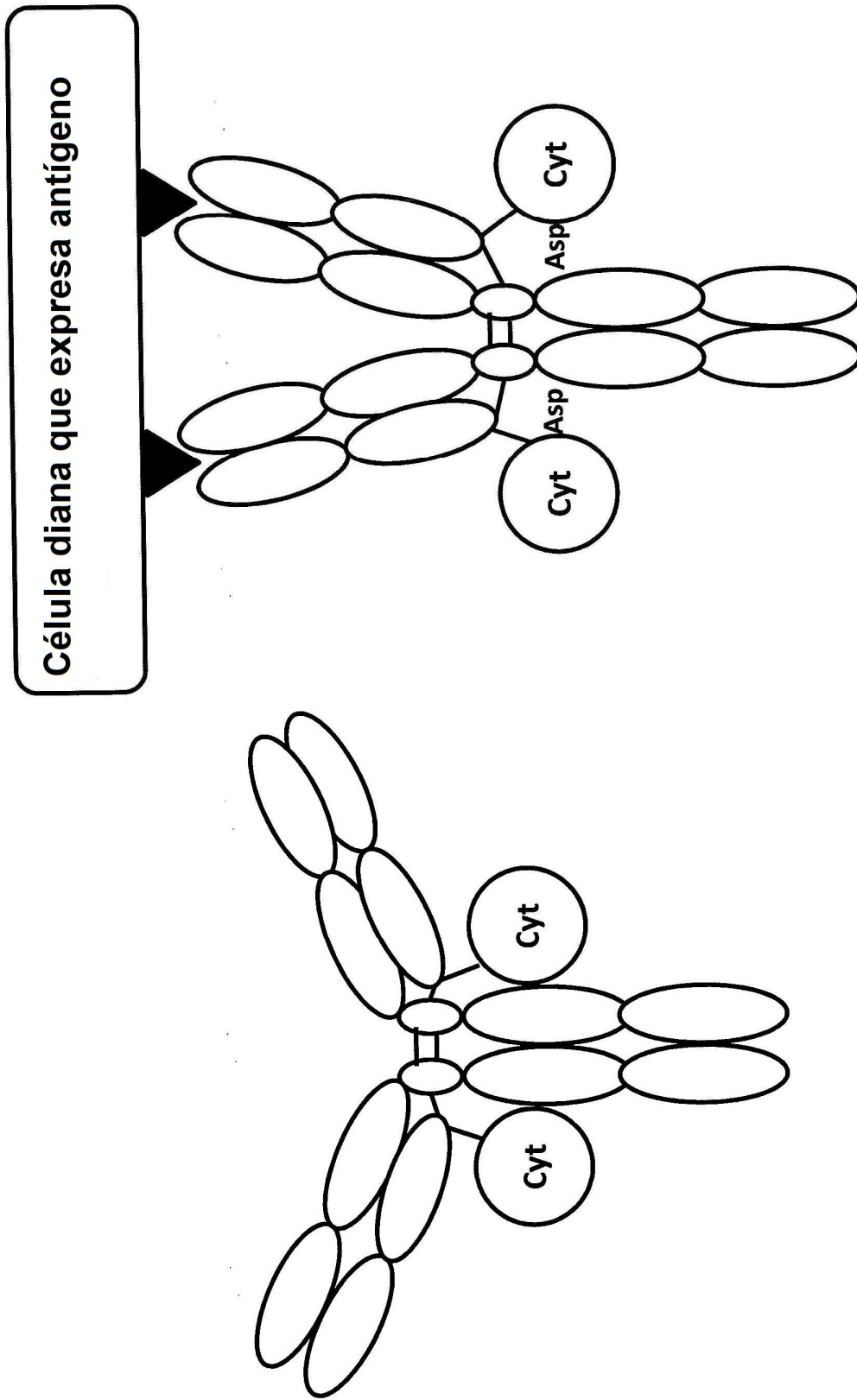


FIG. 3

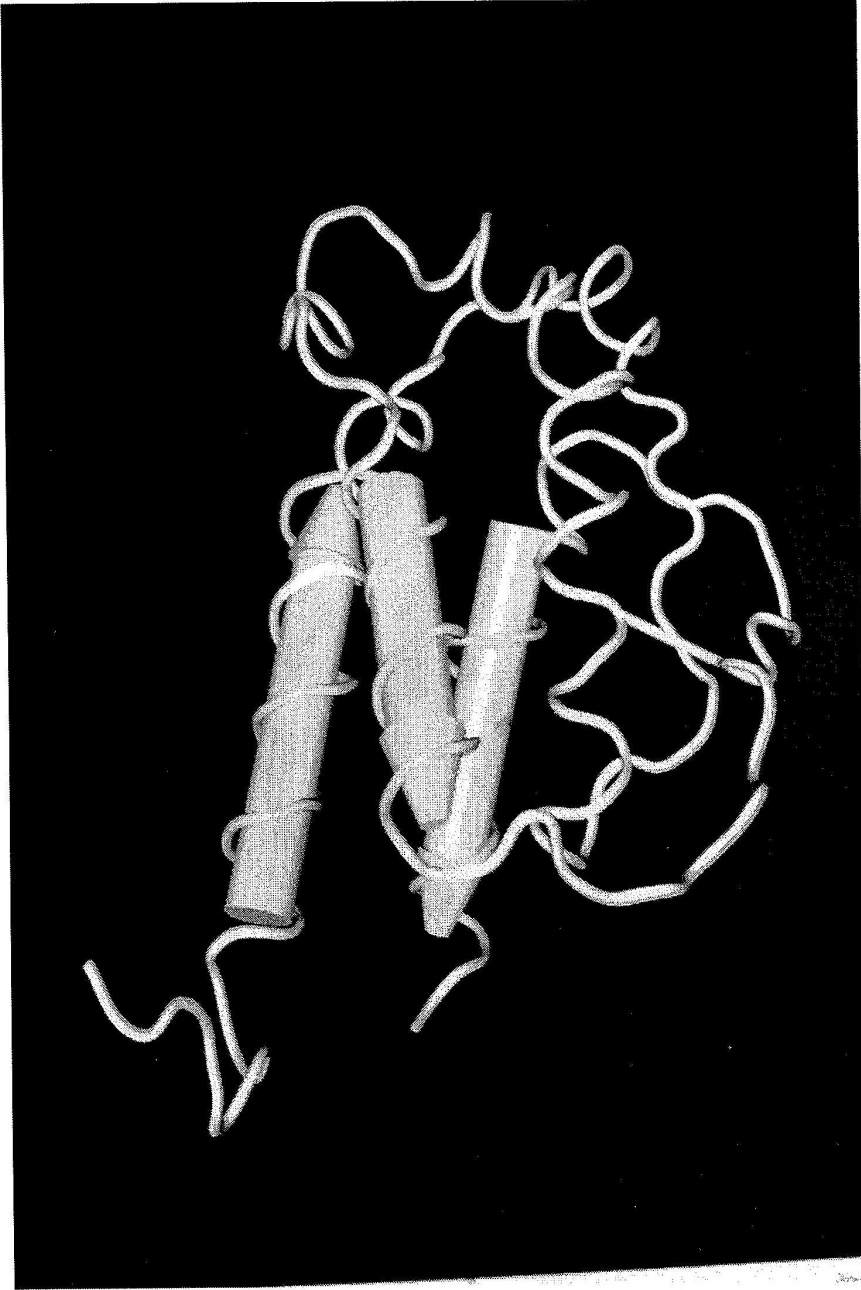


FIG. 4

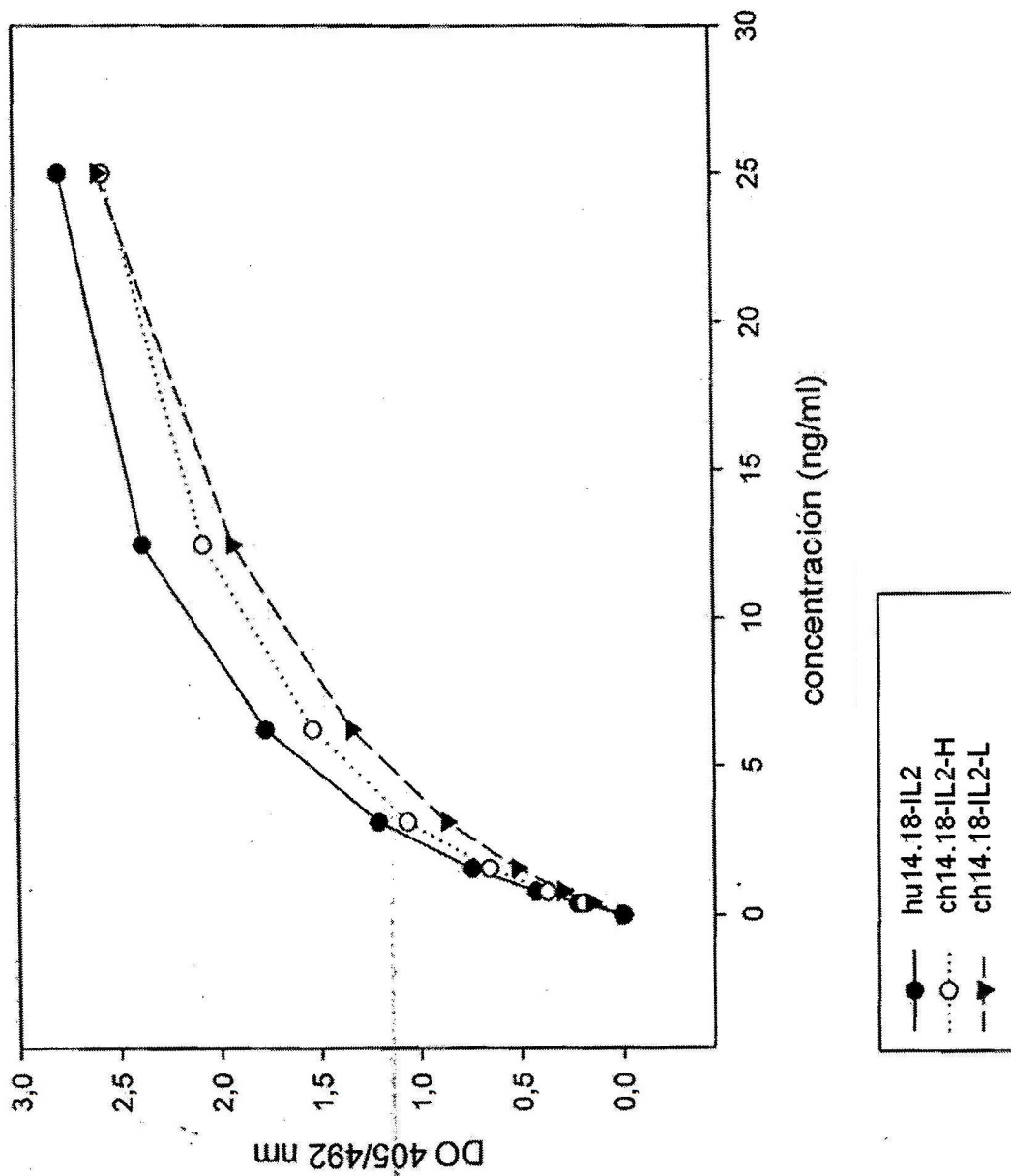


FIG. 5

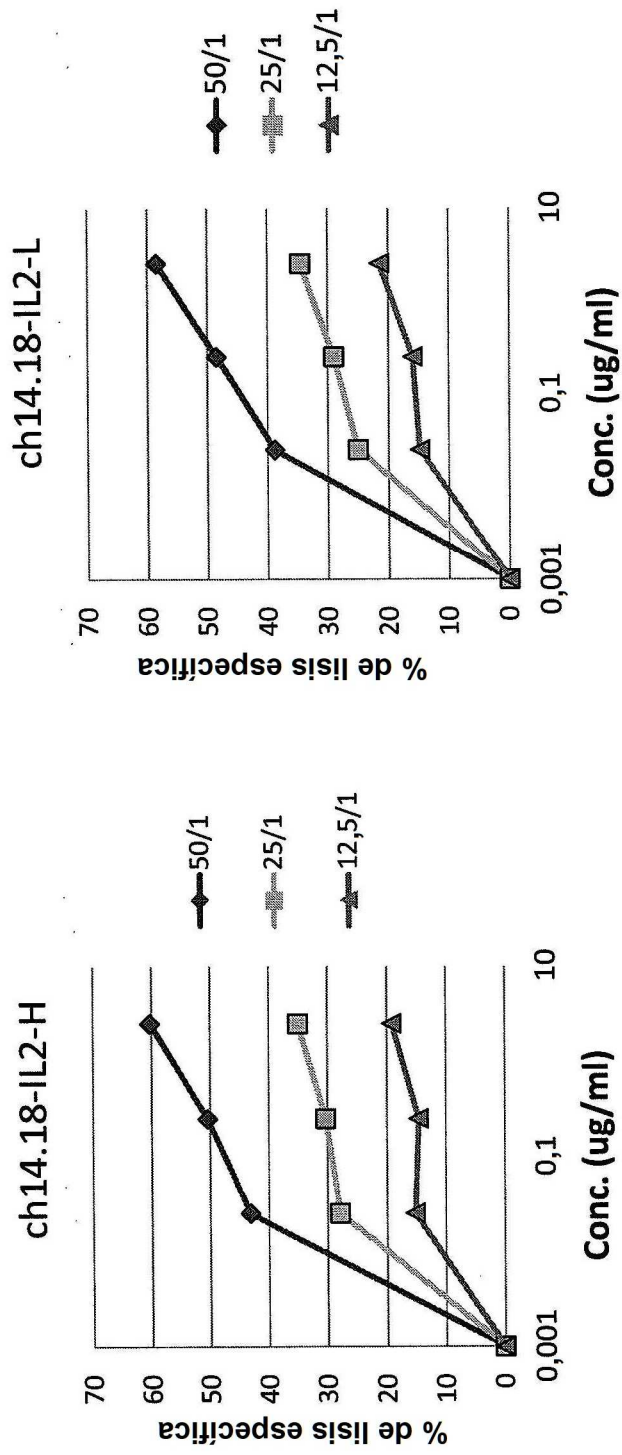


FIG. 6

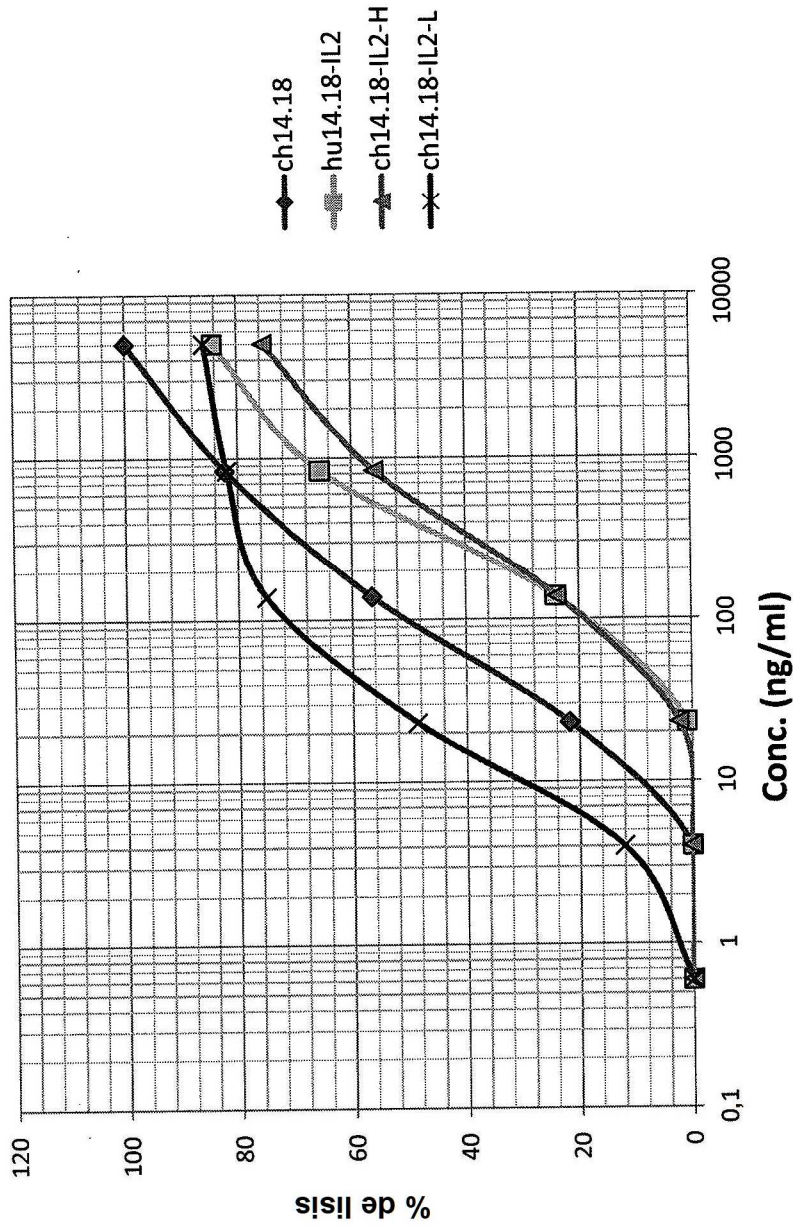


FIG. 7

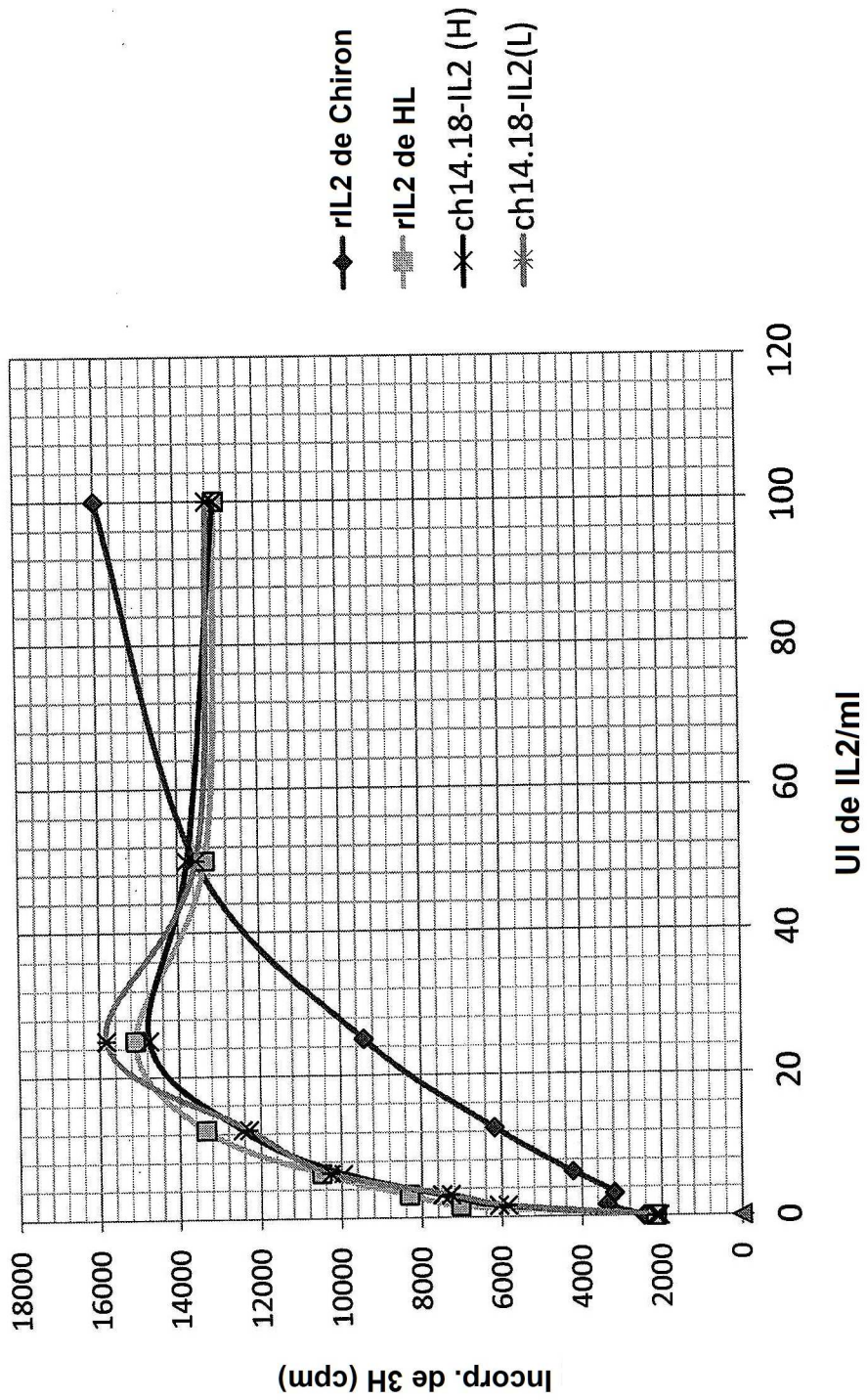


FIG. 8

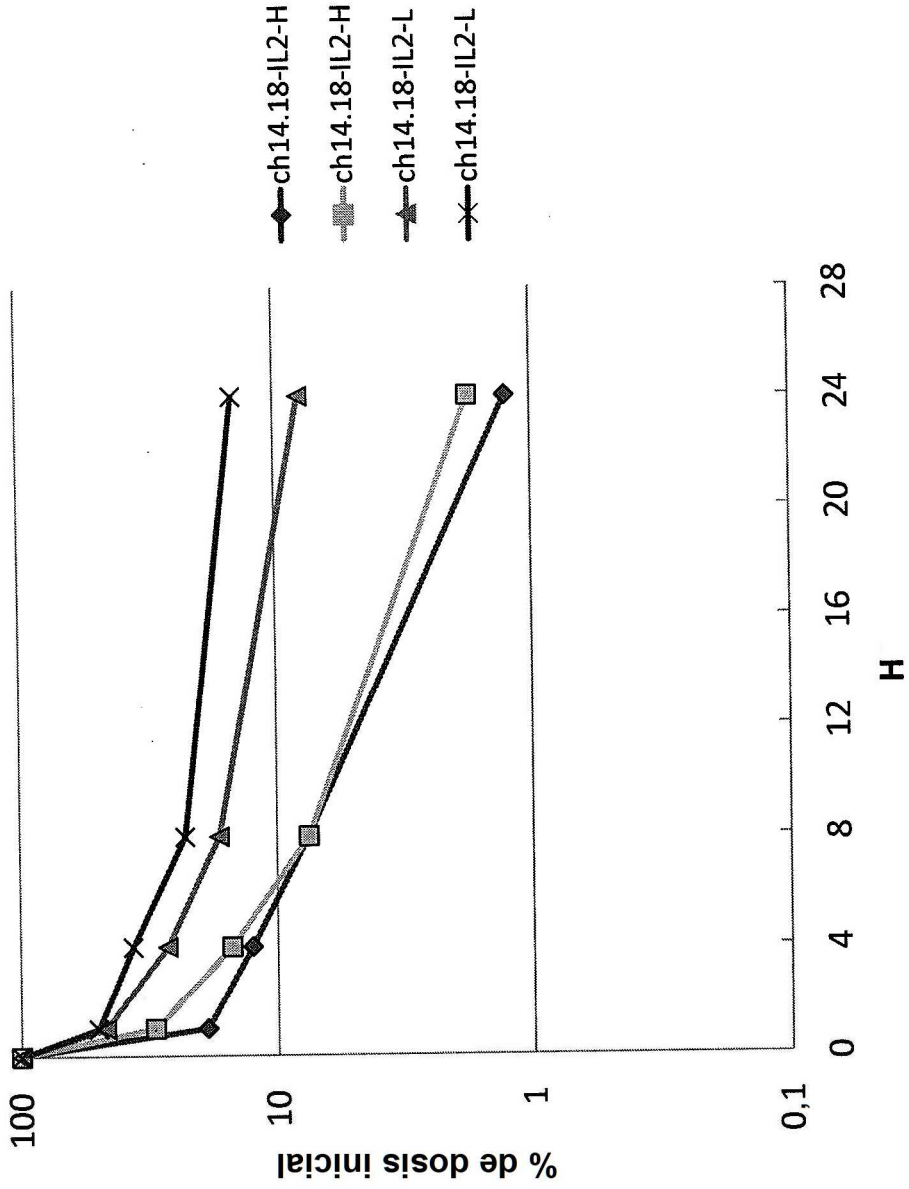


FIG. 9

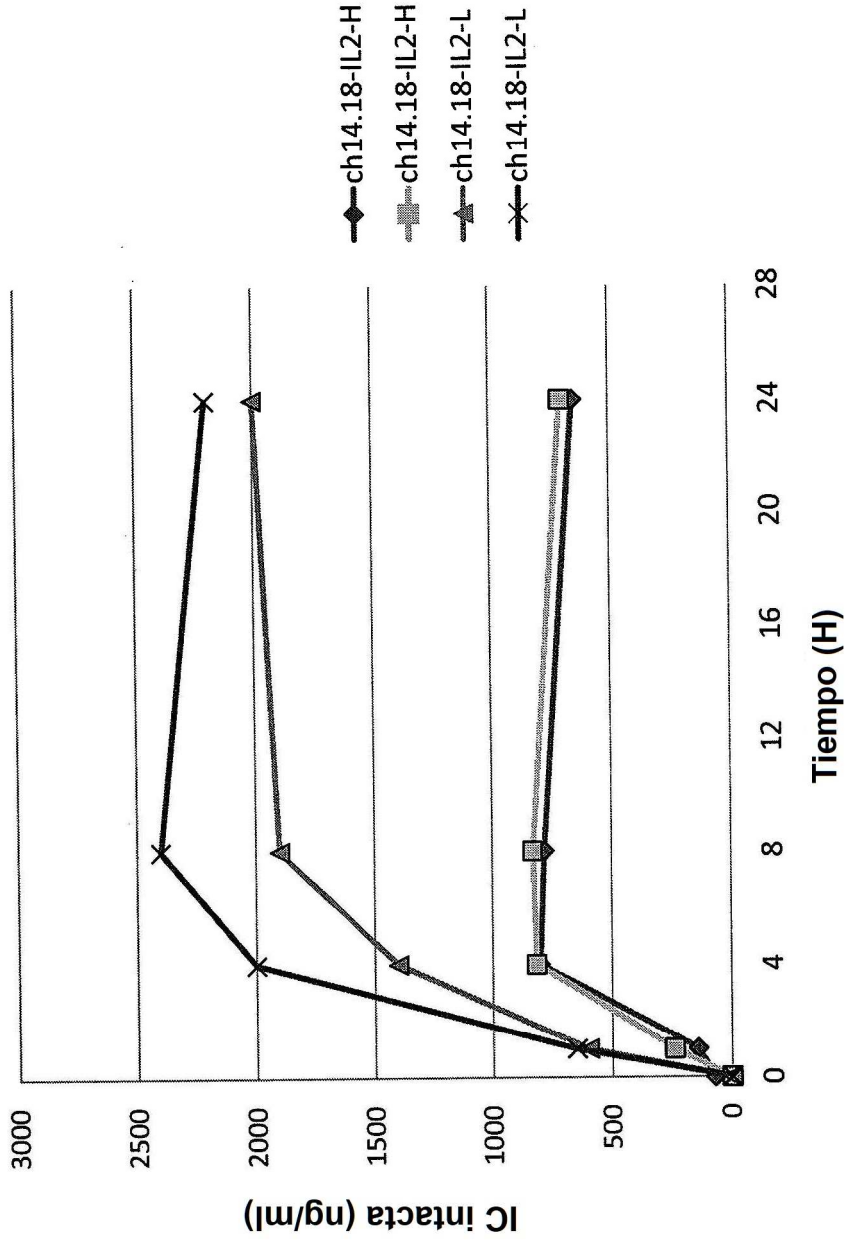
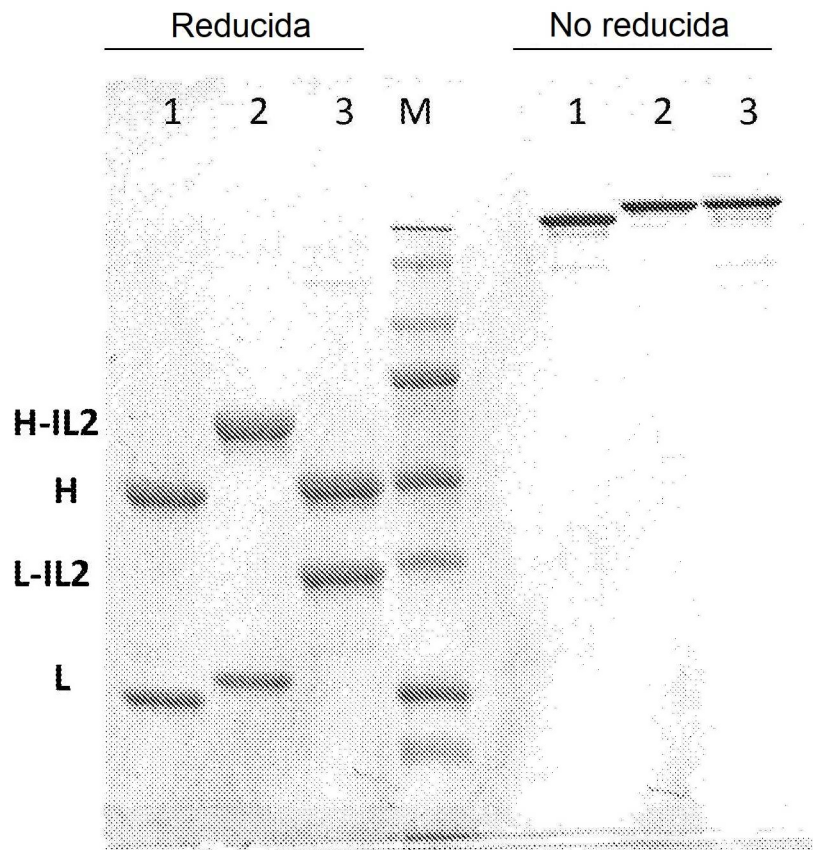


FIG. 10



- 1 Testigo de anticuerpo de ratón
- 2 Anticuerpo H-IL2 (apto para uso clínico)
- 3 14.18-L-IL2 (etapa de proteína A simple)

FIG. 11

